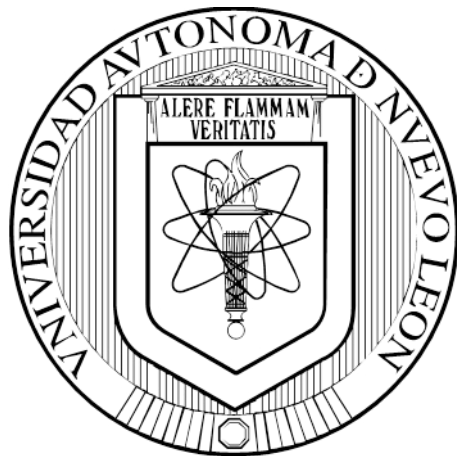


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE ESTATINAS CONTRA
EL VIRUS DEL DENGUE (DENV)**

PRESENTA

OWEN LLOYD BRYAN MARRUGO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE ESTATINAS CONTRA
EL VIRUS DEL DENGUE (DENV)**

Presenta

M. C. Owen Lloyd Bryan Marrugo

Como requisito parcial para optar por el Grado de

**Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

Asesor: Dr. en C. Ana María Rivas Estilla

2015

El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ana María G. Rivas Estilla mediante la concesión de una beca del CONACyT.



“Nuestra recompensa se encuentra en el
esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo
total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Doy en primer lugar las gracias a mis padres, por su guía, su ejemplo, los valores inculcados, el esfuerzo constante para proveerme de las herramientas para mi crecimiento, desarrollo y superación. Gracias a ellos he llegado hasta aquí. A mis hermanas Meyling y Madeleine, las cuales siempre me animan y me demuestran su cariño, A mi tutora, Dra. Ana María Rivas Estilla, por darme la oportunidad nuevamente de pertenecer a su grupo de trabajo, por su ejemplo de esfuerzo constante y amor a la investigación y por sus sabios consejos, no solo académicos sino de vida. A mi comisión de tesis, a los Doctores Barrera, Rojas, Ramos y Vidaltamayo; gracias por compartir su conocimiento y pulir este trabajo y a este alumno. A mis profesores en general que de una u otra manera fueron parte de esta obra. A los que colaboraron externamente con el proyecto; a la Dra. Juany de morfo; la Dra. Leticia Barrón del CINVESTAV y a sus alumnos, Rubén, Moisés y Moisés, Olivia, Carolina, y todos en general. A mis compañeros, Tanya, Sonia, Daniel, Vero, Karina, Diana, Oscar, Selene, Alex, Iker, Elda, Soraya, Yadira, Maribel, Eduardo, Sergio, Jazmín, Mayela y tantos más que ofrecieron su amistad, y su apoyo. A todo el personal de la Facultad, Juany, Normita, Lulú, Ariadna, Irazema, etc. A mis amigos en general, a las personas que estuvieron cerca; las que estuvieron antes, las que están ahora, tanto aquí en México como en otras partes; Marlis, Avis, Brenda, Nelson, Luifer, Marcos, Elías, Katia, Johani. A mis compañeros del TEC, a Nancy Maldonado que me dio la oportunidad, al Dr. Ramos y el Dr. Martín Hernández. A todos los que de una u otra forma participaron para que este Doctorado fuera una realidad, muchas muchas gracias.



Contenido

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY).....	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. HISTORIA DEL DENGUE.....	12
2. EPIDEMIOLOGÍA DEL DENGUE.....	14
2.1. El dengue en las Américas.....	15
2.2. El dengue en México	15
3. AGENTE ETIOLÓGICO	17
3.1. Proteínas Virales.....	19
3.2. Ciclo de replicación del DENV	21
4. VECTOR.....	23
5. FISIOPATOLOGÍA DEL DENGUE	24
6. DIAGNÓSTICO DEL DENGUE	27
6.1. Métodos directos:	28
6.2. Métodos indirectos	29
7. TRATAMIENTO.....	30
7.1. Guías de manejo de dengue	30
7.2. Desarrollo de vacunas Anti-DENV	31
8. DENV Y METABOLISMO CELULAR.....	32
8.1. Dengue y metabolismo de lípidos	32
8.2. Metabolismo de colesterol e infecciones virales	34
8.3. Mecanismo de acción de las estatinas	37
8.4. DENV y genes de respuesta antiviral	38
JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS.....	42
OBJETIVO GENERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	44
MATERIALES MÉTODOS Y REACTIVOS.....	46
1. LÍNEAS CELULARES Y CEPA VIRAL.....	46

1.1.	Células C6/36 HT	46
1.2.	Células BHK-21	47
1.3.	Células Huh-7 parentales.....	47
1.4.	Cepa viral.....	48
2.	REACTIVOS	48
2.3.	Agente de transfección siPort NeoFX	49
2.4.	ARN de interferencia (ARNi):	49
2.5.	Cebadores o primers	49
3.	ESTUCHES COMERCIALES Y EQUIPO.....	49
3.1.	Ensayo de viabilidad celular MTT	49
3.2.	Ensayo de determinación de colesterol intracelular	50
3.3.	Ensayo de titulación viral	50
3.4.	Ensayo de PCR en tiempo real	51
3.5.	Evaluación de la expresión de genes de respuesta antiviral	52
4.	CONDICIONES EXPERIMENTALES	53
4.1.	Ensayo de citotoxicidad.....	53
4.2.	Ensayo de inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol	54
4.3.	Ensayo de inhibición genética de la síntesis de colesterol	55
4.4.	Ensayo de inhibición química de la síntesis de colesterol.....	55
	Resultados	57
1.	ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL Y PERFIL CITOTÓXICO	57
1.1.	Producción de DENV de alto rendimiento	57
1.2.	Evaluación de citotoxicidad de tratamientos experimentales.....	59
2.	INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA Y GENÉTICA DE LA SÍNTESIS Y DEPLECIÓN QUÍMICA DE COLESTEROL	63
2.1.	Inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol: tratamiento con estatinas	63
2.2.	Inhibición genética de la vía de síntesis de colesterol: tratamiento con ARNi- <i>HMGCR</i>	65
2.3.	Inhibición química del colesterol: tratamiento con M β CD	66
3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL POR INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL	68

4. EL EFECTO ANTIVIRAL DE LOS AGENTES BLOQUEADORES DE COLESTEROL ESTÁ MEDIADO EN PARTE POR MECANISMOS ALTERNATIVOS A LA VÍA DE SÍNTESIS DE COLESTEROL	73
5. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA Y GENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA ANTIVIRAL	73
6. LA MODULACIÓN DE LA VÍA DEL COLESTEROL INFLUYE EN LAS TRES VÍAS PRINCIPALES DE MONITOREO Y ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL CELULAR	77
DISCUSION	86
CONCLUSIONES	92
Bibliography	94
Anexo 1	100
Protocolo de cultivo de células C6/36 HT	100
Protocolo de propagación de células BHK-21	103
Protocolo de Propagación de células Huh-7	105
Anexo 2	108
Protocolo de producción de Dengue virus	108
PROTOCOLO DE TITULACION DEL VIRUS DEL DENGUE POR DILUCION LIMITANTE – MÉTODO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (UFPs)	111
PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MTT	114
Protocolo de Transfección siPort NeoFX	117
Protocolo de Extracción de ARN total	119
PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN (RT-PCR M-MLV)	120
PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL	122
PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE COLESTEROL INTRACELULAR	123
PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PCR ARRAY	126

Lista de Tablas

Tabla 1. Vacunas anti-dengue en fase clínica de desarrollo	32
Tabla 2. Propiedades químicas y farmacocinéticas de las estatinas	39
Tabla 3. Expresión de genes de respuesta antiviral	84

Lista de Figuras

Figura 1: Historia epidemiológica del dengue:.. _____	13
Figura 2: Incidencia del dengue. _____	14
Figura 3: Distribución global del dengue _____	17
Figura 4: a) Clasificación taxonómica del DENV _____	18
Figura 5: Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i> _____	25
Figura 6: Clasificación actualizada del dengue _____	26
Figura 7: Fotografías de las extremidades de paciente con dengue hemorrágico _____	27
Figura 8: El colesterol constituye una de las moléculas más abundantes de los organismos vivos. _____	33
Figura 9: Esquemas de tratamiento in vitro. _____	56
Figura 10: Evaluación del efecto citopático del DENV sobre células C6/36 HT (Producción de virus de alto rendimiento) _____	57
Figura 11: Ensayo de UFPs _____	59
Figura 12: Evaluación de perfil citotóxico de los tratamientos experimentales. _____	63
Figura 13: Inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol _____	64
Figura 14: Inhibición genética de la vía de síntesis de colesterol _____	67
Figura 15: Inhibición química del colesterol _____	68
Figura 16: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición farmacológica de la síntesis de colesterol _____	70
Figura 17: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición g de la síntesis de colesterol _____	
Figura 18: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición genética y química de la síntesis de colesterol _____	72
Figura 19: Inhibición simultanea de colesterol y DENV2 _____	74
Figura 20: Perfil de expresión de genes de respuesta antiviral _____	80
Figura 21: Perfil de expresión antiviral. _____	83
Figura 22. Representación esquemática de vías de señalización _____	85

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

Introduction. The pathogenesis of dengue infection still is not completely understood. Although the antibody dependent enhancement theory has been appointed as the major cause for severe dengue, several cases are not consistent with this hypothesis, suggesting that other mechanisms could be involved in the clinical presentations of this illness. Cholesterol levels have been reported to regulate dengue virus (DENV) replication *in vitro* and proved to be necessary to successfully complete the viral life cycle. Also, Lovastatin treatment has reduced viral RNA on a dengue replicon cell system, indicating that other statins and cholesterol inhibiting agents, could have the same antiviral properties. On the other hand, *in vitro* experiments using cholesterol sequestering agents have demonstrated to affect several cellular metabolic pathways including the cell antiviral response. These two aspects of molecular interactions might as well be linked and could provide a deeper understanding about the patho-physiology and clinical progress of dengue infection.

Objective. To evaluate the effect of cholesterol regulation upon DENV replication and the antiviral profile of DENV infected HuH-7 cells. **Materials and Methods.** Cholesterol synthesis was biochemically, by using several statins; genetically, by using HMGCR directed RNAi and chemically, using M β CD; in non-infected and DENV2 MOI 1 infected HuH-7 Hepatoma cells. Cells and supernatant were collected for cholesterol level determination and DENV titer evaluation. DENV viral titer was measured using the Plaque formation unit (PFU) assay in BHK-21 cells and cholesterol levels were evaluated using Caymans cholesterol fluorometric assay and Amplex Red Cholesterol Assay. Also the antiviral profile of treated, un-treated, infected and non-infected cells were assessed using QIAGEN PCR-Array platform. **Results.** A 55 – 70% reduction in DENV titer was observed on four statins tested compared to the untreated control at 48 h p.i. A 12h pre-treatment slightly reduced virus titer as well and the cytopathic effect of DENV2 on Huh-7 cells confirmed these observations. Statin treatment also reduced intracellular cholesterol levels but did not match DENV2 inhibition percentages. Genetic inhibition of cholesterol synthesis also had a mild inhibition effect on DENV2 titer at 48 h.p.i. It was observed that DENV2 infection augmented intracellular cholesterol levels in both sets of experiments. Furthermore a significant change on the antiviral profile of Huh-7 cells was observed on lovastatin and *HMGCR*-RNAi treated cells in which both treatment reduced the expression of genes related to cellular immune response and pro-inflammatory mechanisms. **Conclusion.** Our results indicate that both pharmaceutical and genetic inhibition of cholesterol synthesis cause a reduction of DENV infectious particles and that this effect is only partially met by cholesterol inhibition and could be also related to the modulation of the antiviral profile of the cells. Also, DENV2 infection modulates cholesterol intracellular levels and this is particularly involved on DENV later stages of replication.

Thesis Director: Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla _____.

RESUMEN

Introducción. La patogénesis de la infección por el virus del Dengue (DENV) no ha sido aún entendida completamente. La potenciación mediada por anticuerpos ha sido propuesta como principal factor predisponente de dengue severo, sin embargo múltiples casos no concuerdan con esta teoría sugiriendo la participación de otros mecanismos patogénicos. Se ha reportado que los niveles de colesterol celular influyen en la replicación y ciclo viral del DENV *in vitro*. A su vez, el tratamiento inhibidor de colesterol con Lovastatina (LOV), probó reducir los niveles de ARN viral en un modelo de replicón de DENV *in vitro*, lo cual sugiere que otras estatinas. Por otra parte, experimentos de inhibición de DENV, utilizando agentes secuestradores de colesterol, demostraron modificar vías metabólicas, como la expresión de genes de respuesta antiviral celular.

Objetivo. Evaluar el efecto de la regulación del colesterol sobre el perfil antiviral de células Huh-7 y el resultado final sobre la replicación e infectividad del DENV. **Metodología.** La síntesis de colesterol fue inhibida farmacológicamente (LOV, Pravastatina (PRA), Fluvastatina (FLU), Simvastatina (SIM) y Atorvastatina (ATO)), genéticamente (ARN de interferencia contra la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (ARNi-HMGCR)) y químicamente (metil-beta-ciclodextrina, M- β -CD), en células Huh-7 infectadas o no, con el DENV2. Células y sobrenadante fueron colectados para la evaluación de niveles de colesterol intracelular y título viral. La titulación viral se llevó a cabo utilizando la técnica de unidades formadoras de placa (UFP) en células BHK-21. Los niveles de colesterol intracelular fueron determinados con el Cayman's cholesterol fluorimetric assay. Se evaluó el perfil antiviral de células tratadas e infectadas utilizando la plataforma de qPCR array de Qiagen. **Resultados.** Una reducción en el título viral del DENV2 fue observada en células tratadas 24 h post-infección con FLU, ATO, LOV y SIM obteniendo índices de inhibición de 70%, 70%, 65% y 55% de reducción viral respectivamente comparado con el control sin tratamiento. Al tratar las células 12 h previo a la infección con DENV2, se obtuvo una ligera reducción en el título viral LOV 20%, ATO 30% y FLU 30%. Se realizó también la evaluación simultánea del efecto citopático en las células infectadas y tratadas obteniendo resultados similares. El tratamiento con estatinas redujo también los niveles de colesterol intracelular. Se llevó a cabo también la inhibición genética de la síntesis de colesterol mediante un ARNi – HMGCR bloqueando así la vía. A 48 h post-infección se observó una ligera reducción en el título viral del DENV2. De manera interesante, se observó también un aumento en los niveles de colesterol intracelular de células infectadas en todas las condiciones de tratamiento. Un cambio significativo en el perfil antiviral celular se observó en células infectadas y este efecto fue contrarrestado mediante la inhibición de la vía de colesterol reduciendo la expresión de genes de respuesta inmune y pro-inflamatoria. El tratamiento con el agente quelante de colesterol M- β -CD, no tuvo efecto sobre los niveles de DENV2 y/o sobre la expresión de genes de respuesta antiviral.

Conclusión. Nuestros resultados indican que la inhibición farmacológica y genética de la vía de colesterol tiene un efecto inhibidor en el ciclo de replicación del DENV2 y que este efecto podría estar mediado por la modificación en la expresión de genes de respuesta antiviral celular. Así también que la infección por DENV2 modifica el metabolismo de colesterol celular en etapas tempranas de la infección.

Directora de Tesis: **Dra. en C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla** _____.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de etiología viral se han convertido en uno de los mayores problemas de salud de las últimas tres décadas sobrepasando a las patologías bacterianas, las cuales han sido controladas hasta cierto punto, con el desarrollo de los antibióticos. Desde 1972 a la fecha, más de 50 nuevos patógenos virales han sido identificados, caracterizados y catalogados para luego ser estudiados en busca de terapias eficientes contra las enfermedades que producen [1]. Sin embargo, características como: tropismo específico hacia un grupo limitado de huéspedes, lo cual limita la implementación de modelos experimentales de estudio; un acelerado ciclo de replicación con alta variabilidad y capacidad mutagénica, así como el desarrollo de proteínas virales con capacidad reguladora, han sido barreras que han frenado el estudio y establecimiento de tratamientos antivirales efectivos [2]. Los virus han logrado un alto grado de evolución y supervivencia mediante la producción de copias en grandes números, lo cual se suma a la amplia variabilidad de su secuencia genética. Entre los agentes virales más relevantes de las últimas décadas se encuentra en DENV, el cual ha alcanzado niveles de infectividad sin precedentes, estableciéndose de manera endémica en diferentes latitudes del planeta.

1. HISTORIA DEL DENGUE

Los primeros registros datan de hace aproximadamente 2,000 años. En aquel entonces los reportes de fiebre aguda y dolor de cuerpo eran descriptores de la enfermedad que hoy conocemos como dengue. Se presume que el término “dengue” proviene del Swahili “dinga” que se refiere a cólico, dolor y convulsión. Esta enfermedad se caracteriza por presentarse en brotes esporádicos, espaciados y frecuentemente largos [3]. (Fig.1)

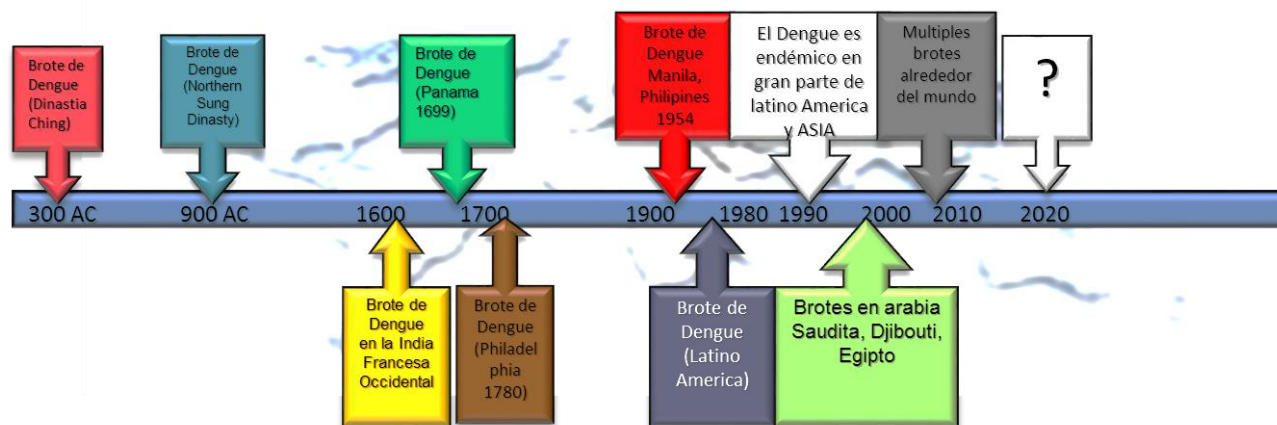


Figura 1: Historia de los brotes del dengue: Línea de tiempo representando el desarrollo y aparición en tiempo y geografía, de las epidemias de Dengue a lo largo de la historia.

En los últimos años, el dengue se ha convertido en un importante problema de salud, poniendo en riesgo de contagio a más de la mitad de la población mundial, con alrededor de 50 millones de nuevos casos cada año [4]. El dengue pertenece a un grupo denominado enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes (EIE y EIREs). La mayoría de estas enfermedades son causadas por agentes patógenos ya existentes, los cuales generan nuevos brotes como resultado de cambios climáticos; crecimiento y movilización poblacional, mutaciones adaptativas, entre otros que resultan en características ventajosas para su desarrollo. Dentro de este grupo pueden mencionarse enfermedades como la malaria, fiebre amarilla, dengue, influenza, cólera, fiebre hemorrágica Marburg, ébola, SIDA, hepatitis C, poliomelitis y fiebre meningocócica, entre otras. Las EIEs/EIREs representan un grave e importante problema de salud. De las 53.9 millones de muertes registradas a nivel mundial en el año 1998, un 25%, lo cual equivale a 13.3 millones, fueron causadas por enfermedades infecciosas [5]. En 2002 las enfermedades infecciosas por sí solas, fueron responsables del 26% de las 57 millones de muertes registradas a nivel mundial. [6].

La cifra se redujo ligeramente en 2004, cuando se estimó que anualmente en el mundo, 13 millones de personas mueren debido a enfermedades infecciosas [7].

2. EPIDEMIOLOGÍA DEL DENGUE

El dengue es una de las enfermedades más importantes en las regiones tropicales y subtropicales. En las últimas cuatro décadas, la infección se ha expandido significativamente, alcanzando millones de casos al año [8]. Anualmente se reportan aproximadamente 230 millones de casos de dengue en todo el mundo, de los cuales 25,000 terminan en muerte [9] (ver la fig.2). A pesar de su relativamente baja tasa de mortalidad, esta enfermedad genera un alto gasto económico para el sector de salud. En el periodo entre los años 2000 y 2007, el costo total debido al dengue en las Américas, alcanzó la cifra de \$2.1 miles de millones de dólares, lo cual representa un gran impacto en el presupuesto de salud pública y privada de los países del nuevo continente [10].

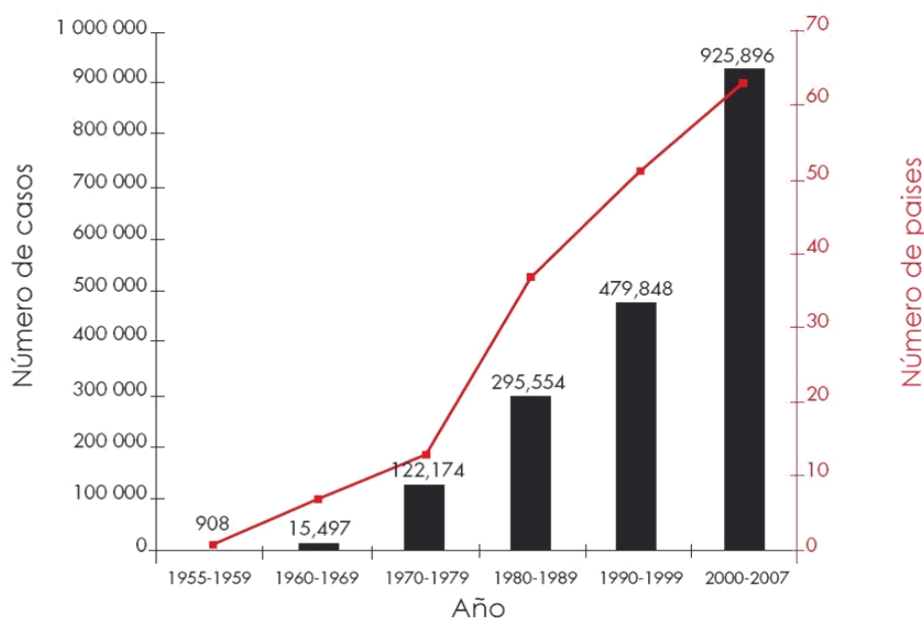


Figura 2: Incidencia del Dengue. Gráfico que indica la incidencia (columnas) y número de países (línea) que reportan casos de Dengue a nivel mundial. De 1955 a 2007. *Dengue WHO Guidelines 2009. World Health Organization Sierra, B. et al. Archives of Virology (2007), 152(3):533--542.*

2.1.El dengue en las Américas

La distribución geográfica de la enfermedad abarca actualmente ya más de 100 países, manteniendo un aumento anual moderado pero constante [11]. En las Américas el dengue se encuentra ampliamente distribuido. Países como Brasil y Ecuador poseen zonas endémicas en donde la infección es permanente. Una rápida diseminación de esta enfermedad ha tenido lugar en las últimas décadas. En 1980, los reportes de la infección por DENV estaban limitados a la zona sur de México, Puerto Rico, Honduras, Colombia y Venezuela. Sin embargo, para 1992, la infección abarcaba además, El Salvador, Nicaragua, Perú, Brasil y Paraguay; para 2002 los reportes de infecciones activas tuvieron lugar en la mayor parte del continente abarcando desde México hasta toda la región centroamericana y Sudamérica, con una incidencia de más de 1 millón de casos [11] (ver fig. 3).

2.2.El dengue en México

La incidencia del dengue en México ha ido incrementándose a un paso moderado y sostenido. En la última década este incremento ha sido notorio, alcanzando cifras importantes no antes documentadas. En el año 2000 la incidencia de morbi-mortalidad de dengue en México D.F. fue de 1.7 casos por cada 100,000 habitantes, mientras que para el año 2012, esta había aumentado a 43.03 casos por cada 100,000 habitantes [12]. La alta densidad poblacional, la extensa zona costera tropical y subtropical y la alta tasa de migración económica y turística, son factores determinantes en la alta incidencia que presentan distintas zonas mexicanas hoy en día. El dengue pasó inadvertido en México hasta la reciente epidemia de 1979-1980, en la cual la re-aparición del DENV serotipo 1 resultó en un incremento importante en el número de infecciones en la región oriente del

país, seguida de un re-surgimiento de la enfermedad en 1995; esta vez a causa del DENV serotipo 3 [13]. En México el dengue se encuentra distribuido de manera heterogénea, encontrándose zonas de baja y alta endemicidad. Para el año de 2006, de acuerdo a reportes de la Secretaría de Salud Federal del gobierno mexicano, se registraron alrededor de 50,000 casos de dengue clásico y 2,000 de dengue hemorrágico [14]. En la actualidad se reportan de 1 – 1.5 millones de casos anuales, y una presencia completa en el territorio nacional con una mayor incidencia en los estados del sur y costa como Chiapas y Quintana Roo [15]. En un estudio internacional en el cual se evaluó el costo al respecto de los sistemas de salud públicos y privados por causa del dengue, se reportó que anualmente se gastan alrededor de 170 millones de dólares en el cuidado y tratamiento de pacientes con dengue. En el mismo estudio se reveló evidencia que confirma una importante cantidad de casos de dengue sub reportados, en donde de 139,000 pacientes sintomáticos y 119 muertes por dengue en México por año, solo se reportan 30,941 pacientes con sintomatología y 59 muertes [16]. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en México (SINAVE), es el encargado de la detección, notificación, análisis epidemiológico y clínico así como también del seguimiento de casos fatales y no fatales. A partir del 2007 se hizo obligatorio la confirmación mediante prueba de laboratorio de todos los casos probables de dengue, así como el reporte en no más de 24 horas de los casos de dengue severo confirmados mediante prueba serológica o aislamiento viral [17]. La implementación de estos sistemas de vigilancia y directrices de detección, diagnóstico y tratamiento, han permitido estructurar una base de datos con información fidedigna la cual habilita el desarrollo de estrategias terapéuticas y de control eficientes. La figura 5 muestra la distribución por serotipos de DENV en la República Mexicana.

3. AGENTE ETIOLÓGICO

El dengue es causado por el virus del mismo nombre, DENV, un flavivirus miembro de la familia flaviviridae, a la cual también pertenece el virus de la hepatitis C. Todos los miembros del género flavivirus son arbovirus, es decir transmitidos al humano mediante artrópodos hematófilos lo cual podría explicar el por qué estos virus que pasan parte de su ciclo vital en un artrópodo de sangre fría, pudieran volverse más virulentos en un momento dado debido a cambios climáticos y aumento de las temperaturas [18].



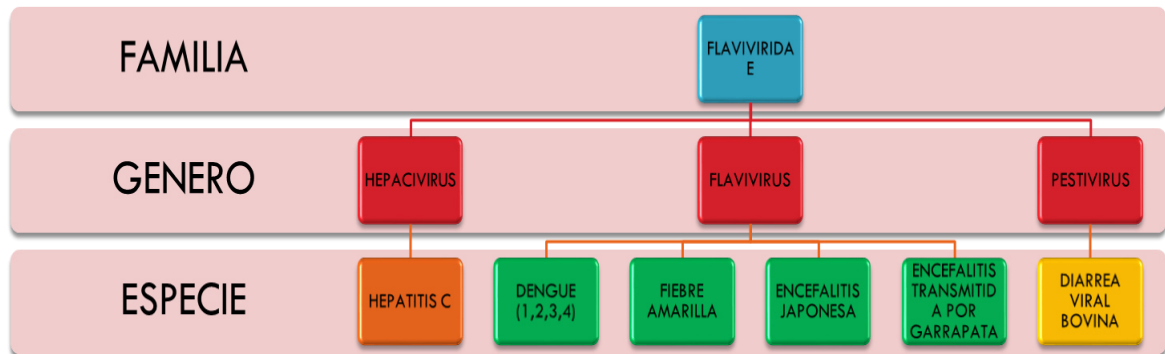
Figura 3: Distribución global del dengue, 2010. Modificado de: OMS Información para el viajero internacional <http://www.who.int/ith/en>.

Las características morfológicas del DENV comprenden:

- A) Un ácido nucleico tipo ARN de cadena sencilla de polaridad positiva.
- B) Una extensión de hebra de ARN de aproximadamente 11 Kb.

- C) Un ARN consistente en un solo marco de lectura abierto que da lugar a una poliproteína de procesamiento co- y post-traducciona.
- D) Una nucleocápside icosaédrica asociada al ARN
- E) Una envoltura lipídica que rodea y protege al virión dando un tamaño final de 40 a 50 nm de la partícula viral [19].

a)



b)

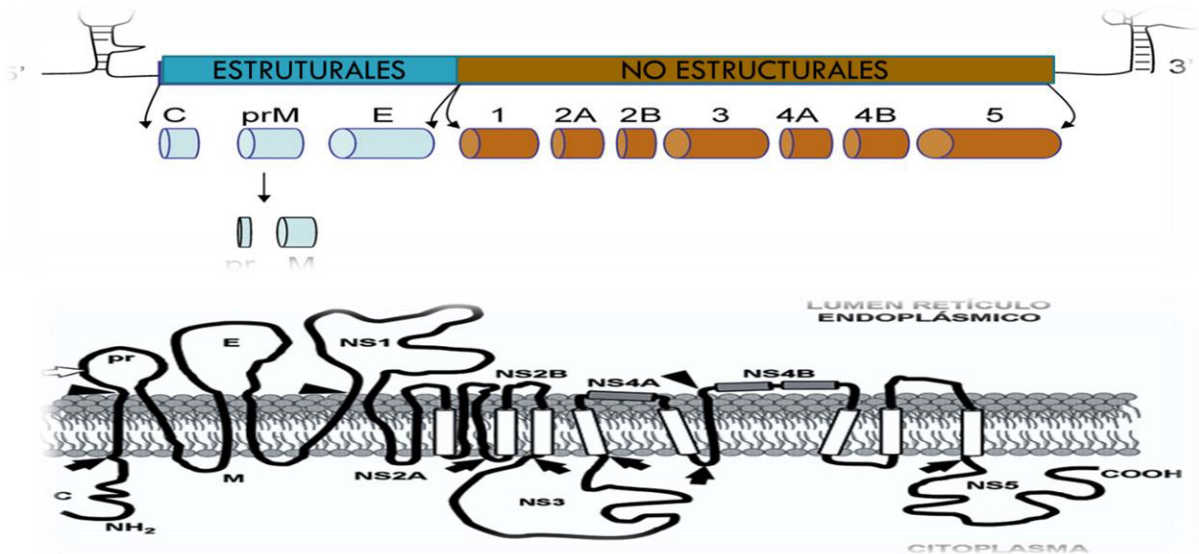


Figura 4: a) Clasificación taxonómica del DENV. Clasificación taxonómica del DENV por Familia, Género y Especie. b) Estructura y distribución genética y proteica del DENV. Representación gráfica del material genético del DENV. Del extremo 5'a 3'. Marco de lectura abierto único (arriba). c) Arreglo y localización de proteínas del DENV en la membrana del retículo endoplásmico durante la traducción, incluyendo dominios transmembrana y sitios de corte (abajo).

En la figura 4a se presenta la clasificación taxonómica del virus del DENV y figura 4b, la estructura de la partícula viral. El DENV comparte género con los virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa y virus de la encefalitis transmitida por garrapata. Los flavivirus, incluyendo al DENV, se sub-dividieron originalmente basándose en su reacción a pruebas serológicas. Existen 4 DENV serotípicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, los cuales comparten de un 50 a un 75% de similitud en su secuencia génica. El ARN del DENV codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales [19].

3.1. Proteínas Virales

3.1.1. Proteínas estructurales:

- **Proteína C:** También conocida como proteína core, es la primera proteína en ser sintetizada durante la traducción del genoma viral. Tiene un peso molecular de 13,500 daltons. Esta proteína forma la cápside viral y gracias a su carácter básico es capaz de interactuar con el ARN. Análisis estructurales comprueban que esta proteína, no glicosilada, está conservada en el género flavivirus, sin embargo no tanto como otras proteínas como la de envoltura E, la cual es el determinante antigénico principal del virus y la base para el desarrollo de vacunas [19].
- **Proteína M:** La proteína M es originalmente generada a partir de un precursor, proteína pr-M de 22,000 daltons, la cual es posteriormente cortada dando lugar a la proteína M de 8,000 daltons. Este corte, el cual sucede justo antes de la liberación de la partícula viral, es crucial para la estructura final del DENV y una correcta maduración y futura infectividad [19].

- **Proteína E:** La proteína de envoltura o proteína E es el componente principal de la envoltura viral. Posee un peso de 50 – 61 mil daltons y se asocia en homotrímeros en la superficie del virus. La proteína E es la más altamente conservada entre flavivirus, lo cual puede ser debido a su importante participación en el reconocimiento de receptor, acercamiento y entrada del virion a la célula. La proteína E es también el principal determinante antigénico del DENV y es el blanco principal de posibles vacunas para la prevención de esta enfermedad [19].

3.1.2. Proteínas No Estructurales:

- **Proteína NS1:** NS1 es la primera proteína no estructural. Pesa 48,000 daltons y es encontrada frecuentemente en forma de dímeros. Esta proteína es sintetizada en el retículo endoplásmico y su presencia ha sido demostrada en el citoplasma celular, en la membrana citoplasmática e incluso en el suero de individuos infectados, por lo cual es utilizada para realizar el diagnóstico de dengue en sangre. Se presume que tiene participación en el complejo de replicación del DENV.
- **Proteína NS2:** La región codificante de la proteína NS2 da lugar a dos proteínas, NS2a y NS2b. La NS2a se ha identificado como una proteína de aproximadamente 20,000 daltons con un dominio trans-membrana la cual ha sido identificada como un factor necesario para el procesamiento proteolítico de la proteína C. NS2b, por su parte, es una proteína de aproximadamente 14,500 daltons sin función conocida hasta el momento pero se sospecha de igual manera su participación en la replicación viral.

- **Proteína NS3:** La NS3 tiene un peso molecular de 70,000 daltons. Presenta actividad de proteasa y participa activamente en el procesamiento de la poli-proteína viral, una vez traducida. También se le atribuyen propiedades de ARN polimerasa. [19].
- **Proteína NS4:** Al igual que el gen NS2, la secuencia NS4 da lugar a dos proteínas, NS4a y NS4b de 16,000 y 27,000 daltons respectivamente. Su función precisa es desconocida aun, sin embargo se presume, actúa como co-factor de la polimerasa viral.
- **Proteína NS5:** La ARN polimerasa dependiente de ARN es una proteína de 105,000 daltons, la cual es encargada de la replicación del ARN viral cuya secuencia está altamente conservada dentro del género [19].

3.2.Ciclo de replicación del DENV

El ciclo viral del DENV, al igual que otros virus envueltos, comienza con el acercamiento de la partícula viral a la membrana celular. El proceso de acercamiento es de naturaleza fortuita cuando un inóculo mínimo necesario de partículas virales entra en contacto y permanece en cercanía de la membrana celular de una de las varias células blanco de este virus. El DENV tiene como células diana principales a células del sistema inmune: Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos CD4+ y CD8+. Sin embargo, también se ha comprobado su infectividad sobre células endoteliales, varias líneas celulares hepáticas, células fibroblásticas y neuronales *in vitro*, para las cuales posee epítopes de reconocimiento para receptores en la superficie celular [20]. El acercamiento viral es seguido de la internalización y fusión vía endocitosis mediada por receptor. El DENV utiliza receptores tipo Fc y receptores sensitivos a tripsina para generar cambios en la estructura de la membrana celular y envoltura viral para penetrar al interior de la célula. Los primeros (receptores Fc) son de importancia en el proceso de potenciación mediada

por anticuerpo. De manera interesante, Damonte y Castilla reportaron en 2009 dos vías de entrada utilizadas por el DENV. En este estudio *in vitro*, utilizando anticuerpos contra receptores en la superficie celular, se demostró que el DENV1 puede utilizar un proceso de endocitosis mediada por clatrina para llevar a cabo la infección de células Vero, mientras que DENV2 utiliza una vía totalmente independiente de clatrina para infectar la misma línea celular. Sin embargo y de manera sorprendente, en el mismo estudio se reportó que el DENV2 utiliza una vía dependiente de clatrina para infectar células A549 [21]. Estos hallazgos indican una alta variabilidad y capacidad de adaptación de los mecanismos de infección entre serotipos, permitiendo al virus utilizar vías alternativas de infección en función de la célula a infectar. La internalización del DENV se da dentro del endosoma, una estructura lipídica formada por la invaginación de la membrana celular en el punto de contacto con el virus. Una vez dentro de la células, el pH ácido del citoplasma celular provoca cambios estructurales en las proteínas E y M de la partícula viral. Dicho cambio transforma la superficie antes lisa del virus, en una estructura rugosa con espículas hidrofóbicas, estas espículas se unen entonces con la membrana del endosoma dando así lugar a la fusión de la membrana y liberación del material genético. La internalización y fusión del virus son seguidas por la liberación del material genético e inmediata traducción de proteínas virales. El ARN del DENV comprende un sólo marco de lectura abierto el cual al ser de polaridad positiva, puede ser directamente traducido para generar a una poli-proteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Esta, es cortada por enzimas celulares y virales dando lugar a los polipéptidos virales que tras su maduración y procesamiento interactúan con proteínas, moléculas y factores celulares y promueven la replicación viral, la cual se lleva a cabo en dominios de replicación ricos en colesterol y lípidos en el citoplasma celular. Esto es así ya que al sintetizarse la cadena poliproteica viral en el retículo endoplásmico, las proteínas no estructurales NS1, NS2b, NS4 y NS5 participan

en la formación del complejo de replicación el cual se une a la hebra positiva de ARN viral para dar lugar a una hebra de polaridad negativa. La hebra de polaridad negativa y la hebra de polaridad positiva permanecen unidas formando una doble hélice en la cual la hebra negativa sirve como plantilla para la formación de ARN viral. Una vez se han producido suficientes hebras de ARN viral y se han traducido suficientes proteínas virales, comienza el ensamblaje y maduración que consiste en la formación de viriones, partículas virales inmaduras las cuales se ensamblan y maduran en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, respectivamente, en donde el ARN viral se une a la proteína de cápside (proteína C) del DENV y es envuelta por las proteínas E y pr-M. La proteína pr-M es un precursor de la proteína M la cual, en su forma inmadura, cubre la superficie del virión para evitar su fusión temprana. Mientras el virión atraviesa las membranas del aparato de Golgi, cambios conformacionales en la pr-M permiten la maduración de la misma una vez que llega a la membrana celular. Finalmente la liberación de la partícula viral se da a través de la gemación de la membrana citoplasmática. *In vitro*, el proceso desde el acercamiento de la partícula viral hasta la aparición de viriones de nueva formación en el citoplasma, toma entre 12 a 16 h [22] [23] [24].

4. VECTOR

El vector transmisor del DENV es un mosquito del sub-género *stegomya*: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes polynesiensis* de los cuales, *Aedes aegypti* es el de mayor distribución a nivel mundial. El vector adquiere el virus al picar a un individuo enfermo e incuba el mismo en su tracto gastrointestinal (Fig. 5). Los mosquitos infectados son capaces de transmitir la infección durante 10 - 12 días. La hembra del mosquito es la única transmisora de la enfermedad; mide aproximadamente 5 mm y vive alrededor de un mes. El *Aedes aegypti* pica con mayor frecuencia durante el día y la tarde. Este tipo de mosquito se ha adaptado exitosamente para vivir en zonas

urbanizadas, cerca o dentro de las viviendas. La hembra lleva a cabo la ovoposición en la superficie del agua estancada ya sea en recipientes naturales o artificiales realizando una ovipostura cada 72 horas, depositando de 50 a 200 huevos cada vez. Los huevecillos tardan 9 días en eclosionar y los mosquitos llegan a vivir hasta 30 días [25]. A finales de los 60's la mayoría de las enfermedades transmitidas por vector, no eran consideradas ya más una amenaza de salud debido a los programas de control sistemáticos y a gran escala utilizando insecticidas. Sin embargo, estos programas fueron suspendidos al comprobar la toxicidad y potencial mutagénico y carcinogénico de varios de los agentes químicos utilizados en la fabricación de pesticidas. Veinte años después, el vector y el Dengue resurgieron, ahora en una ambiente propicio de gran urbanización y globalización, causando pandemias como la de 1998, con más de 1.2 millones de casos reportados y estableciéndose de manera endémica en distintas zonas de Latino América y el Sudeste Asiático [26]. En 2014, se registraron más de 13 millones casos de dengue en las Américas, aproximadamente 80,000 progresaron a dengue hemorrágico, la forma severa de la enfermedad [27]

5. FISIOPATOLOGÍA DEL DENGUE

La infección por cualquiera de los cuatro serotipos hasta ahora conocidos de DENV, resulta en un cuadro clínico de similares características, abarcando un rango sintomatológico que va desde:

- A) Malestar sub-clínico leve en aproximadamente 30% de los casos;
- B) Fiebre por dengue caracterizada por fiebre, mialgia, leucopenia, y petequias en aproximadamente 70% de los casos.

C) Dengue hemorrágico en aproximadamente 1% de los casos, acompañado de: fiebre, shock, diátesis hemorrágica y una significativa tasa de mortalidad [28] [29].

Aedes aegypti



Figura 5: Mosquito *Aedes aegypti*, principal vector transmisor del dengue. <http://www.nacionaltucuman.com.ar/?p=14724>

La patogénesis que explica y da lugar al cuadro clínico de la infección y a su posterior desenlace no ha sido entendida completamente y los factores que determinan la severidad de esta enfermedad no están bien definidos. Sin embargo, entre los factores de riesgo involucrados en la susceptibilidad y pronóstico del dengue se pueden mencionar: la cepa y serotipo viral; raza y estado inmunológico del individuo, edad y de manera importante, la infección heterotípica secundaria de un individuo o la infección primaria de infantes hijos de madres inmuno-sensibles, que permite la interacción de anticuerpos no neutralizantes de una infección previa con un serotipo de DENV diferentes al causante de la enfermedad presente.

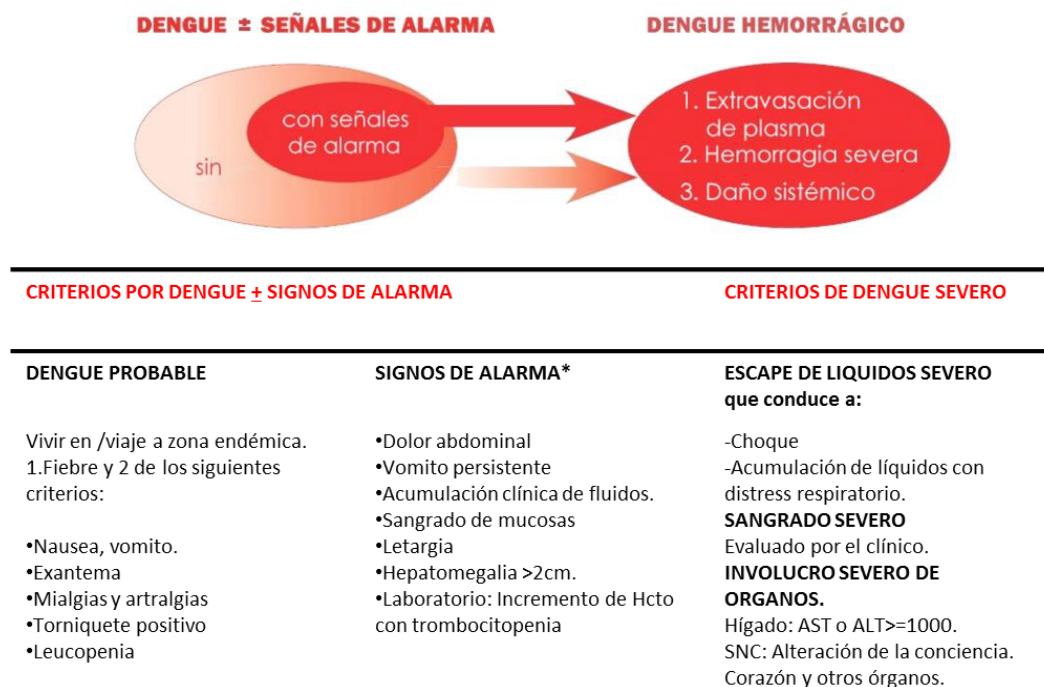


Figura 6. Clasificación actualizada del dengue. Nueva clasificación del Dengue en base a los signos y síntomas presentados. Guía de diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Nueva edición, Ginebra, OMS 2009.

Esta teoría ha sido denominada potenciamiento mediado por anticuerpos (ADE), y ha sido propuesta como la explicación fisio-patológica para el desarrollo de dengue severo (dengue hemorrágico y shock por dengue). Esta teoría explica que en presencia del DENV se generan anticuerpos neutralizantes específicos del serotipo infectante de manera vitalicia. Sin embargo, estos anticuerpos proveen protección sólo temporal contra los serotipos restantes por lo cual en una infección heterotípica subsecuente, anticuerpos sin capacidad neutralizante se unirían a las partículas virales y una vez en su superficie potenciarían el reconocimiento e interacción receptor-receptor facilitando el acercamiento y unión del DENV a las células blanco, aumentando así el número de células infectadas, la producción viral y por consiguiente la exacerbación de los

síntomas. Aun cuando esta teoría ha sido ampliamente aceptada y hasta cierto punto comprobada en diferentes modelos de estudio, se han presentado casos contradictorios en los cuales pacientes de prima infección han desarrollado dengue severo mientras que pacientes re-infectados con serotipos diferentes han presentados síntomas leves, característicos de dengue clásico. Es evidente que un estudio más profundo de la fisiopatología del dengue es necesario ya que otros factores fisiológicos y metabólicos podrían estar involucrados.



Figura 7. Fotografías de las extremidades de paciente con dengue hemorrágico. Se pueden observar petequias a lo largo de la piel de brazos y piernas (izquierda). Brazo de paciente con dengue hemorrágico. Resultado positivo de la prueba del torniquete. **Prevalencia del dengue asintomático, por serología, en menores de 15 años** <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1415/5/Prevalencia-del-dengue-asintomatico.-por-serologia.-en-menores-de-15-a-%F1os->

6. DIAGNÓSTICO DEL DENGUE

Una larga lista de procedimientos de detección ha sido desarrollada para el diagnóstico de la infección por DENV. La selección del método diagnóstico depende del propósito del mismo, ya sea este para diagnóstico clínico, vigilancia epidemiológica, desarrollo de vacunas, etc. y también

de la capacidad y recursos disponibles. Existen métodos directos e indirectos para determinar la infección por DENV los cuales se enlistan a continuación.

6.1.Métodos directos:

- **Aislamiento:** El aislamiento del DENV es el método más confiable y también más laborioso para el diagnóstico de la infección. Se realiza mediante la infección de células en cultivo utilizando el suero del paciente. La línea celular mayormente utilizada es C6/36. Una línea celular derivada del tracto digestivo de mosquitos *Aedes albopictus*. El aislamiento viral sólo es efectivo cuando la muestra es tomada en la etapa de viremia.
- **Detección del genoma viral (PCR):** La detección del genoma de DENV es otro método diagnóstico directo y consiste en la extracción del ARN de células mononucleares de la sangre del individuo infectado para su posterior análisis por PCR. El protocolo más ampliamente utilizado para esta técnica es el descrito por Lanciotti en 1992. El fundamento de esta técnica consiste en el uso de oligonucleótidos con secuencias consenso para el diseño de cebadores (D2) complementarios para secuencias comunes en el ARN de los 4 serotipos de dengue. Mediante la técnica de retro-transcripción, estos cebadores amplifican un fragmento de cDNA de 511 pb. Una vez producido este fragmento, se realiza una PCR tradicional (35 ciclos de desnaturalización, unión y extensión) agregando un segundo cebador (D1). El producto de amplificación resultante puede ser evaluado de dos formas: hibridación dot blot con sondas serotipo específicas o, amplificación por PCR anidada con cebadores serotipo específicos que generan productos de amplificación de tamaños únicos para cada serotipo viral [30].

- **Detección de la proteína viral NS1:** La detección de la proteína viral NS1 es la prueba más comúnmente utilizada para el diagnóstico rápido de la infección por DENV. El fundamento de esta prueba se basa en la inmunocaptura de la proteína NS1 con anticuerpos policlonales específicos fijados a una superficie. Durante una infección activa, ya sea *in vitro* (en células de mamífero) o en pacientes infectados, se ha comprobado la liberación de la proteína NS1 al sobrenadante o suero sanguíneo respectivamente. Se estima que la proteína NS1 del dengue es detectable a partir del día 1 de la aparición de fiebre hasta el día 9, tiempo aproximado para la desaparición de los síntomas clínicos. La proteína NS1 puede ser detectada aun cuando la determinación del ARN viral sea negativa. Los niveles de proteína NS1 varían entre individuos, sin embargo su concentración no presenta una relación significativa con la severidad o estadio de la infección, por lo cual en la mayoría de los casos, esta prueba se limita a proveer un resultado cualitativo [31] [32].

6.2.Métodos indirectos

- **Detección serológica de IgM:** Como su nombre lo indica, esta técnica consiste en la detección de anticuerpos IgM por medio de un kit en el cual se encuentran fijados a una placa, antígenos específicos ya sea de grupo (flavivirus) o serotipo (DENV 1 – 4). La detección mediante esta prueba está limitada a llevarse a cabo en etapas tardías de la infección, ya que la producción de anticuerpos IgM comienza 5 – 6 días post-infección. Estos anticuerpos son indetectables a partir de 40 días después de la presentación de síntomas.
- **Detección serológica de IgG:** Al igual que con las IgM, la detección de IgGs se lleva a cabo mediante un ensayo de ELISA. Los anticuerpos IgG son detectables a partir de

5 – 7 días post infección y alcanzan su pico máximo entre 14 – 21 días post-infección.

La detección de anticuerpos IgG puede resultar en falsos positivos, ya que existe la posibilidad de reactividad cruzada con otros flavivirus [31].

7. TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento específico para la infección por DENV y el manejo de los pacientes está limitado al control de los síntomas y mantenimiento del apoyo vital en los casos más severos.

7.1. Guías de manejo de dengue

La reducción en la mortalidad del Dengue requiere de un proceso organizado el cual garantice el oportuno reconocimiento de la enfermedad, su manejo y posible referencia a otro centro. Las actividades de cuidado de primer nivel comprenden:

- Reconocer que el paciente febril podría padecer de dengue
- Notificación temprana a las autoridades de salud pública acerca de casos con sospecha.
- Manejo de pacientes en la etapa febril.
- Reconocimiento del estadio temprano de trasvasación de plasma y fase crítica para el inicio de terapia de fluidos
- Reconocimiento de pacientes con signos de alarma, los cuales requieren ser referidos para admisión en centros de salud de segundo nivel para terapia intravenosa de fluidos.
- Reconocimiento y manejo de trasvasación severa de plasma y shock, hemorragia severa y falla orgánica de una manera adecuada y eficiente [33].

Es así que el éxito en cuanto al tratamiento del Dengue, tanto a nivel individual (paciente) como colectivo (población), depende en gran medida de la habilidad y pericia del médico tratante en cuidados de primer nivel, de la disponibilidad y celeridad diagnóstica y del establecimiento de sistemas de vigilancia, detección y comunicación públicos que garanticen la disponibilidad oportuna de información para así tomar medidas necesarias tiempo.

7.2.Desarrollo de vacunas Anti-DENV

En el 2011, la compañía Sanofi Pasteur anunció la entrada a estudios clínicos fase III de su prototipo de vacuna contra el dengue, la cual a la fecha ha mostrado resultados prometedores [34]. Actualmente la vacuna tetravalente candidato está siendo evaluada en tres estudios clínicos simultáneos, que en su totalidad involucran más de 35,000 pacientes en edades entre 2 y 16 años, en el Pacífico de Asia y en Latino-américa. Es importante mencionar que dado a la patología del Dengue y la importante participación del sistema inmunológico en la patogénesis de la infección, una vacuna contra el DENV deberá proveer protección simultánea contra los cuatro serotipos para evitar el efecto de potenciación mediada por anticuerpo (ADE). Actualmente la vacuna se encuentra en fases finales de los ensayos clínicos y se presume estará disponible al público para el año 2016 [34]. De igual manera, se ha documentado la efectividad *in vitro* de algunos compuestos sintéticos y de origen natural con propiedades antivirales contra el DENV, sin embargo ninguno ha tenido impacto significativo en la clínica. En la tabla 1 se presentan las vacunas anti dengue que se encuentran en desarrollo actualmente.

Tabla 1. Vacunas anti-dengue en fase clínica de desarrollo

TIPO DE VACUNA	LABORATORIO DE DESARROLLO	PAÍS	ESTADIO CLÍNICA	EMPRESA FARMACEUTICA
Vacuna Tetravalente (Virus atenuado)	Mahidol University	Tailandia	Fase 3	Sanofi Pasteur
Vacuna Tetravalente (Virus atenuado)	WRAIR	EEUU	Fase 2	Glaxo Smithkline Biologicals
Vacuna Quimérica	NIAID, NIH	EEUU	Fase 2	No Licenciada

8. DENV Y METABOLISMO CELULAR

Una vez que el DENV penetra la célula, el ciclo viral completo se lleva a cabo en el citoplasma celular, en íntima asociación con membranas y organelos celulares. En estudios previos a este trabajo, se ha reportado que las vías metabólicas de colesterol y lípidos, participan y son moduladas durante la infección por flavivirus y para el DENV, varios estudios han confirmado la relación cercana que existe entre la infección por DENV y el metabolismo de lípidos.

8.1.Dengue y metabolismo de lípidos

En reportes recientes se ha comprobado la capacidad del DENV para interactuar con lípidos presentes en los distintos organelos celulares. En el artículo de Harris y cols. del 2012 se reportó, entre otros hallazgos, la capacidad del DENV de promover la reabsorción de cuerpos lipídicos al retículo endoplásmico. Esto para promover el re-arreglo de membranas, la replicación y la expresión de proteínas virales en este organelo [35]. En un análisis más profundo se determinó que

tanto en células de mosquito como en células de mamífero, existe una diferencia de hasta 85% en cuanto al contenido de lípidos de la membrana celular debido a la presencia del DENV. Se encontró que particularmente lípidos con la capacidad de desestabilizar o provocar curvaturas en membranas, así como lípidos que afectan su permeabilidad, son abundantes en células infectadas con DENV [36].

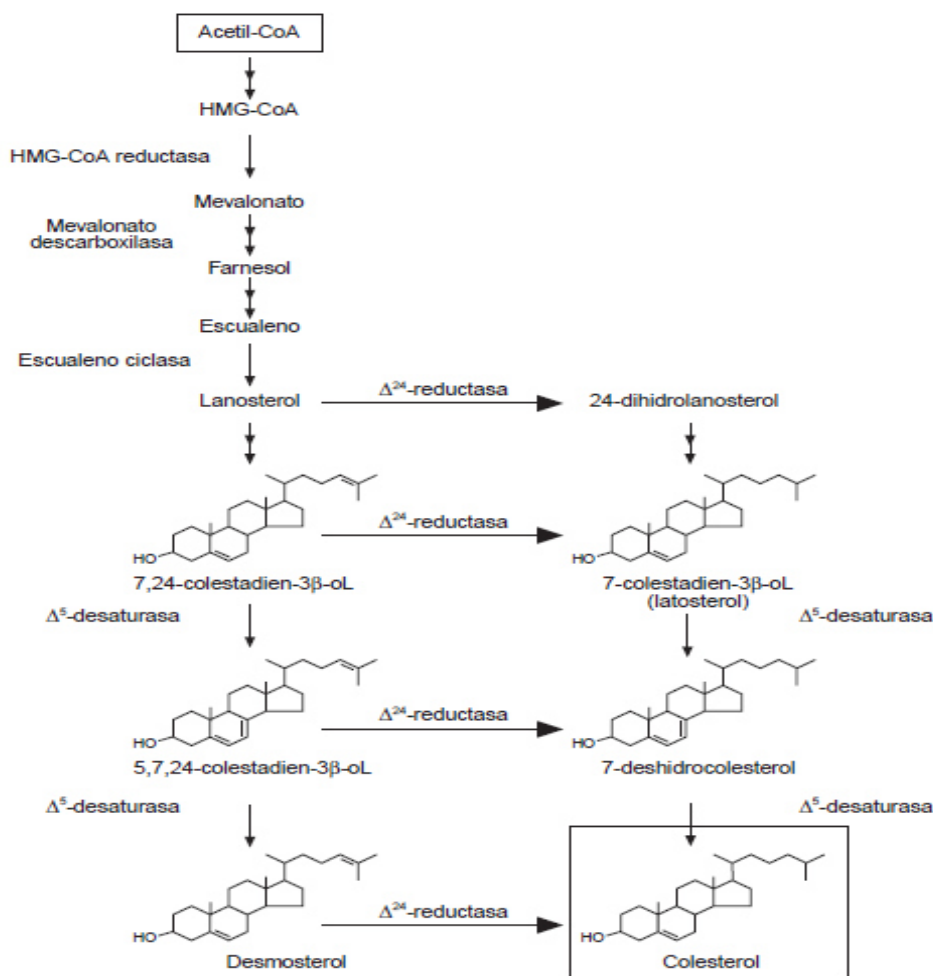


Figura 8: El colesterol constituye una de las moléculas más abundantes de los organismos. Sus funciones van desde proporcionar un soporte estructural y funcional a la célula, hasta participar en la maduración de proteínas, síntesis de organelos celulares e incluso señalización celular y nerviosa. En esta figura se muestra un esquema de la vía de síntesis de colesterol. Pueden apreciarse los diferentes sub-productos a lo largo de la vía y el punto regulador de la reacción el cual es la conversión de hidroximetil coenzima A (HMG CoA) a mevalonato por parte de la enzima hidroximetil coenzima A reductasa (HMGCR). <http://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-efecto-los-fitosterol-sobre-biosintesis-13051682>

La interacción DENV – lípidos ha sido especialmente evaluada en células hepáticas. En estas se encontró que la proteína de cápside (proteína C) del DENV, interactúa con cuerpos lipídicos en células hepáticas. Utilizando microscopía de fuerza atómica fue posible demostrar una fuerza de unión de 33.6 pN entre la proteína C y los cuerpos lipídicos, lo cual representa una interacción fuerte, la cual es dependiente de los niveles de potasio. Se encontró también que el mayor ligando de la proteína C es la perilipina 3 en la superficie de estos cuerpos [37]. Estos, entre otros muchos hallazgos han demostrado la importante relación entre el DENV y las moléculas de naturaleza lipídica como componentes de organelos celulares para la replicación de virus, elementos estructurales de membrana para la formación de la partícula viral e incluso como factores de señalización para la modulación de vías metabólicas que favorezcan la infección.

8.2. Metabolismo de colesterol e infecciones virales

El colesterol es uno de los principales componentes de la membrana citoplasmática y de membranas de otros organelos celulares como el retículo endoplásmico. Al igual que los lípidos, está relacionado de manera cercana con el ciclo de vida de muchos virus envueltos y no envueltos [38]. Esta interacción ha sido demostrada en diversos ensayos, en donde la modulación de la vía de síntesis de colesterol durante una infección viral activa, influye en la eficiencia de replicación y por consiguiente en la intensidad de los síntomas y desenlace final de la infección. De igual manera se ha puesto de manifiesto que la inhibición artificial de la vía, tiene un efecto represor sobre la producción viral e incluso sobre la infectividad de las partículas producidas. Ling, YL 2008, reportó el uso de agentes secuestradores de colesterol (M- β -CD y Filipin III), para tratar células infectadas con DENV. En este estudio se obtuvo un efecto antiviral notorio al aplicar el tratamiento en estadios tardíos de la infección afectando mayormente las etapas de ensamblaje y gemación de la partícula viral. Un ligero efecto antiviral fue observado al tratar las células una

hora antes de la infección, lo cual podría indicar un efecto virucidal del compuesto al contacto directo con las partículas virales [39]. Sin embargo, en el mismo estudio se observó que la adición de colesterol al medio de cultivo en etapas tempranas de acercamiento y fusión viral, boqueaba de manera efectiva el progreso de la infección por DENV y disminuía la tasa de replicación viral [39]. Este efecto inhibidor del colesterol, pareciera coincidir con resultados de dos ensayos clínicos del 2002 y 2009, en los cuales pacientes con un perfil de lípidos con valores elevados, presentaban un mejor pronóstico en la infección por DENV, incluyendo una menor tasa de mortalidad [40] [41]. Existen muchas interrogantes en cuanto a cómo los virus utilizan la maquinaria celular para hacer más eficiente su replicación y asegurar la producción viral. Varios estudios han comprobado la participación del colesterol presente en las membranas celulares en las etapas de acercamiento y entrada de los virus a la célula, implicando la participación de balsas lipídicas para la replicación del DENV y la necesidad de dominios ricos en colesterol para la formación de la partícula viral [42] [43]. De igual manera se ha reportado que la presencia del DENV es capaz de promover un re-arreglo de membranas celulares, tales como la expansión del retículo endoplásmico la cual se presenta en estadios tempranos de la infección y que es el resultado de la modulación del transporte de colesterol por parte de la interacción de proteínas virales y celulares [35]. Puerta y cols. concluyeron que la expresión de proteínas virales del DENV incrementa de manera específica la formación e balsas lipídicas y los niveles intracelulares de colesterol total en estadios tempranos de la infección al promover la captación de partículas LDL y la actividad de la HMG-CoA reductasa [44]. Aún más, estudios *in vitro* demostraron la importancia de la vía de síntesis de colesterol en la fusión, replicación y ensamblaje viral. En 2009 se reportó que el tratamiento con un ARN de interferencia contra la enzima mevalonato descarboxilasa, enzima clave en la vía de síntesis de colesterol, reduce la replicación del virus en un sistema *in vitro* de replicón de DENV

e incluso en modelos experimentales con virus vivo [45]. De igual manera, el tratamiento farmacológico de células infectadas con DENV usando agentes secuestradores de colesterol, resultó en el bloqueo efectivo de la replicación del virus al tratar las células con ácido zaragocico e himeglusina. Sin embargo este tratamiento no tuvo efecto en el sistema de replicón de DENV [45]. Otro estudio reciente demostró que los niveles de colesterol en la envoltura del DENV son importantes para una infección efectiva y que la extracción del colesterol de la membrana que envuelve la partícula viral con agentes secuestradores de colesterol, resulta en un virus con baja o nula infectividad. Sin embargo en el mismo estudio la depleción del colesterol de la membrana celular no tuvo efecto sobre la infectividad del DENV, esto en diferentes líneas celulares animales y humanas [46]. Estos hallazgos aparentemente contradictorios sugieren que a diferencia de otros virus envueltos, la unión y entrada del DENV a la célula es independiente del colesterol de la membrana celular pero dependiente del colesterol en la envoltura viral y que los agentes quelantes y secuestradores del colesterol ejercen un efecto virucidal directamente sobre las partículas virales pero no un efecto antiviral al adicionarse al medio una vez que la partícula viral haya penetrado la célula. Por otra parte, la inhibición genética y farmacológica de la vía de síntesis de colesterol, parece interrumpir estadios tardíos en la infección por DENV, como lo son la replicación, ensamblaje de la partícula viral, maduración y gemación. Estudios recientes en los cuales se han utilizado estatinas como lovastatina (LOV), fluvastatina (FLU) y pravastatina (PRA) para inhibir la vía de síntesis intracelular de colesterol, demostraron que al bloquear esta vía se disminuye la replicación del DENV, siendo el efecto más notorio en estadios tardíos de la infección [44] [47]. Las estatinas se encuentran entre los fármacos más utilizados actualmente en la clínica. Su estructura molecular es homóloga a la HMG CoA, por lo cual resultan ser muy efectivas al inhibir competitivamente a la enzima HMGCR y por ende bloquear la síntesis de colesterol. A la fecha

varias estatinas se encuentran ya en el mercado indicadas para el tratamiento de hiperlipidemias, entre las cuales se pueden mencionar Lovastatina (LOV), Atorvastatina (ATO), Pravastatina (PRA), Fluvastatina (FLU) y Simvastatina (SIM), todas ellas con estructuras y propiedades particulares. La implementación de las estatinas ha revolucionado la clínica en lo referente al tratamiento de la hipercolesterolemia y patologías derivadas. Sin embargo a lo largo de su historia otras aplicaciones farmacológicas se han propuesto para estos compuestos. La tabla 2 muestra las propiedades químicas y farmacocinéticas de estas cinco estatinas.

8.3.Mecanismo de acción de las estatinas

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMGCR, enzima limitante en la vía de síntesis de colesterol. Ejercen su efecto al unirse de manera no covalente al sitio activo de la enzima HMGCR y así bloquear su acción. La disminución de colesterol en los hepatocitos (en donde es llevada a cabo la catálisis de las estatinas) dispara una señal para el aumento en la producción de receptores de colesterol LDL, incrementando así la captación de estas moléculas del torrente sanguíneo por parte de las células y así disminuyendo su concentración. También hay evidencia de que las estatinas inhiben la síntesis de apolipoproteína B-100 en el hígado y reducen la producción de lipoproteínas ricas en triglicéridos [48]. Sumado al efecto benéfico de las estatinas en el tratamiento de la hipercolesterolemia, se han reportado varios efectos colaterales, independientes a la vía de colesterol, como son:

- **Mejoramiento de la función endotelial:** Este efecto que en parte puede estar relacionado con la reducción de colesterol, ha probado ser a su vez el resultado de la inducción transcripcional del gen de la óxido nítrico (NO) sintasa, enzima encargada de la síntesis de NO, segundo mensajero en múltiples vías metabólicas [48].

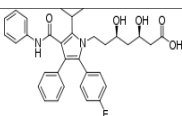
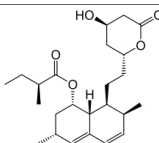
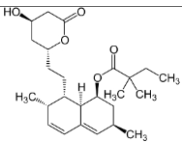
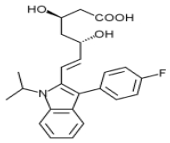
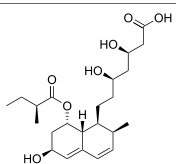
- **Inhibición del crecimiento celular:** Las estatinas han demostrado tener un efecto citostático sobre diferentes líneas celulares, muchas de ellas involucradas en los procesos inflamatorios de organismos superiores mediados por macrófagos, linfocitos, células de musculo liso, etc [48].
- **Efecto antitumoral:** Las estatinas han demostrado toxicidad contra múltiples líneas celulares tumorales. En el artículo de revisión: “In vitro Anti-tumor effects of statins” se mencionan varias publicaciones en las cuales se ha reportado la capacidad antitumoral de diferentes estatinas, probando así su potencial en terapias ajenas a dislipidemia [49].

8.4.DENV y genes de respuesta antiviral

Es evidente que los mecanismos detrás de la interacción del DENV con compartimentos celulares ricos en colesterol, aún permanecen sin una explicación satisfactoria. La propiedad inhibitoria de algunos agentes bloqueadores de colesterol contra el DENV parece depender de factores como el serotipo viral, la línea celular utilizada, así como también del agente inhibitorio y el estadio del ciclo viral en el cual se administre el tratamiento. Sin embargo es posible que tales efectos antivirales puedan estar mediados por la regulación de vías celulares metabólicas, lo cual conlleve a cambios en el perfil antiviral celular y subsecuentemente a una reducción en la replicación viral. Existe solo un puñado de reportes en los que se relacionan patógenos celulares, el metabolismo de colesterol y el perfil antiviral celular. Los virus no son capaces de sintetizar colesterol, por ello han desarrollado mecanismos para controlar la producción y transporte del colesterol celular y promover su propia replicación y desarrollo utilizando dominios ricos en

colesterol como punto de entrada a la célula, balsas lipídicas y membranas del retículo endoplásmico para la replicación viral y ensamblaje celular [50].

Tabla 2. Propiedades químicas y farmacocinéticas de las estatinas

Nombre	Reducción de LDL-C (%)	Metabolismo	Unión a proteína (%)	Vida media	Hidrofílica	Estructura química
Atorvastatina	26 – 60	<i>CYP3A4</i>	98	13–30	No	
Lovastatina	21 – 42	<i>CYP3A4</i>	>95	2 – 4	No	
Simvastatina	26 – 47	<i>CYP3A4</i>	95 – 98	1 – 3	No	
Fluvastatina	22 – 36	<i>CYP2C9</i>	98	0,5 – 3,0	No	
Pravastatina	22 – 34	Sulfación	43 – 67	2 – 3	Sí	

En estudios previos en los cuales se evaluó la infección por DENV en ratones, fueron detectados niveles incrementados de dos quimosinas importantes: CCL3 y CCL5. El aumento de estas quimosinas en el bazo e hígado de los ratones resultó ser indicativo de dengue severo. En el mismo estudio, niveles reducidos del gen IL-6 fueron también encontrados en ratones infectados y esta reducción tenía una relación con una presentación leve de la enfermedad [51]. El trabajo del 2011 de Penghua y cols. reporta una modificación en genes antivirales, como resultado de la infección por dengue. En este trabajo, el gen ISG15 estimulado por interferón, fue sobre-expresado en células infectadas con DENV2. Cabe mencionar que este gen ha sido implicado de manera directa con la función anti-DENV de la célula vía ISGylación de proteínas, determinándose así que su expresión facilita la respuesta antiviral celular [52]. Al evaluar los posibles factores de interacción en la infección por DENV, es importante recordar que las principales células diana del virus son las células de estirpe inmunológica, a saber monocitos, células dendríticas, macrófagos entre otras. Estas células se caracterizan por la capacidad de producir y promover la expresión de genes para proteínas y moléculas de respuesta antiviral e inflamatoria. En el artículo de Carvalho, 2014 se evaluaron las alteraciones en múltiples genes de respuesta inflamatoria como resultado de la acción de la proteína NS1 del DENV en pacientes con dengue hemorrágico. En células positivas CD14⁺ de estos pacientes, se encontraron alteraciones en los genes TNF- α y Óxido Nítrico los cuales podrían ser cruciales para la inmunopatogénesis de la enfermedad. Al mismo tiempo la expresión del gen TLR4 resultó incrementada en pacientes con fiebre de dengue al compararlos con pacientes con dengue hemorrágico, lo cual mantuvo relación con los niveles de la proteína viral NS1 en el suero de estos pacientes [53]. Estos hallazgos sugieren que en la infección temprana por DENV, varios parámetros de la respuesta innata celular son modificados y que esta modificación determina, al menos en parte, la fase y severidad de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

La infección por DENV ha pasado de presentarse en brotes aislados y esporádicos, a ocupar el 1^{er} lugar entre enfermedades arbovirales a nivel mundial. Actualmente más de 100 países presentan riesgo de infección alrededor del mundo y esta cifra va en aumento. Hasta la fecha no existe una terapia específica para el tratamiento de la infección por dengue. El soporte vital y manejo de la sintomatología son las alternativas disponibles actualmente y los mismos representan un gasto anual millonario para los sistemas de salud públicos y privados. La interacción del DENV con el metabolismo de lípidos y compartimentos ricos en colesterol, plantea diferentes opciones para la implementación y evaluación de blancos terapéuticos potenciales. Sin embargo la disparidad observada en cuanto a los resultados obtenidos, hace necesario un estudio más detallado de los mecanismos y moléculas involucrados en esta interacción. Es evidente que el bloqueo de la síntesis de colesterol tiene un efecto directo sobre el ciclo viral del DENV; sin embargo, la evidencia que existe al respecto no es concluyente y hasta cierto punto contradictoria. El estudio detallado de mecanismos moleculares que relacionen el DENV, colesterol y vías de señalización celulares, podrá servir como base para el desarrollo de terapias anti-Dengue específicas, dirigidas contra potenciales blancos terapéuticos.

HIPÓTESIS

El colesterol presente en la envoltura viral y no así el contenido en la membrana celular juega un papel crucial en la entrada del virus a la célula. De igual manera el contenido de colesterol en compartimientos intracelulares es necesario para llevar a cabo y completar el ciclo de vida del DENV, sirviendo como punto de anclaje para la formación del complejo de replicación, materia prima para la formación de la partícula viral y potencialmente, como mensajero para la modificación de vías de señalización metabólicas que favorezcan la propagación de la infección. En este sentido se plantean las siguientes interrogantes: ¿Cuáles son los efectos esperados sobre la replicación del DENV, al bloquear la síntesis de colesterol mediante agentes con diferente acción inhibitoria? ¿Los agentes inhibidores de colesterol, ejercen su efecto de manera directa o mediante la modulación de vías metabólicas de señalización?

En base a lo planteado, la hipótesis de este trabajo es la siguiente: El efecto inhibitorio de los agentes bloqueadores de la vía de colesterol está, al menos en parte, dado por la modificación de genes de respuesta antiviral celular.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la relación entre los niveles de colesterol y el DENV mediante la inhibición farmacológica, genética y química de la síntesis de colesterol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un método *in vitro* de amplificación y cuantificación para el DENV, para obtener partículas virales infectivas a títulos altos y un sistema confiable de determinación de título viral.
2. Determinar el perfil citotóxico de 5 estatinas (lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y atorvastatina) así como de la metil- β -ciclodextrina en nuestro sistema experimental.
3. Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica y genética de la síntesis de colesterol en la replicación y capacidad infectiva del DENV2.
4. Evaluar la modulación de la expresión de genes antivirales inducida por la inhibición farmacológica y genética de colesterol en presencia y ausencia del DENV2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Establecimiento del sistema experimental:

- Creación de stock viral: Para la amplificación viral y creación de los stocks de DENV2 se infectaron células C6/36 HT en cajas T-75 con DENV2. Se llevó a cabo una producción viral semilla la cual posteriormente se utilizó para la producción en masa de partículas virales. Las partículas virales producidas se purificaron y concentraron en solución de Polietilen Glicol.

La titulación viral se realizó mediante el método de Unidades formadoras de placa (UFPs) en células BHK-21.

- Propagación de células: Se utilizaron células C6/36 HT y Vero exclusivamente para la amplificación viral. Los ensayos de titulación viral, fueron llevados a cabo en células BHK-21. Los ensayos de bloqueo farmacológico y genético de la síntesis de colesterol se realizaron en la línea celular Huh-7 parental.
- Ensayo de citotoxicidad: Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos utilizados en el sistema experimental de células Huh-7 parentales mediante el ensayo de viabilidad celular MTT.

2. Desarrollo de ensayos de inhibición:

Células Huh-7 parentales infectadas con DENV2 fueron tratadas pre y post infección con estatinas y pre-infección con ARN de interferencia y metil- β -ciclodextrina (M β CD) a las concentraciones determinadas previamente mediante el ensayo de citotoxicidad y a tiempos

determinados mediante el análisis bibliográfico. Se utilizaron células no tratadas, con y sin infección, a manera de control experimental.

3. Evaluación de resultados

- El sobrenadante celular fue utilizado para evaluar los títulos virales mediante el ensayo de UFPs.
- El extracto celular fue procesado en buffer lipofílico para evaluar la concentración de colesterol.
- La expresión de genes de *HMGCR* y *GAPDH* se evaluó mediante la extracción de ARN total de las células.
- Se evaluó también la expresión de genes de respuesta antiviral celular mediante microarreglos de PCR utilizando PCR en tiempo real.

MATERIALES MÉTODOS Y REACTIVOS

1. LÍNEAS CELULARES Y CEPA VIRAL

1.1.Células C6/36 HT

1.1.1 **Línea celular:** Para la producción de partículas virales y el establecimiento de stocks de trabajo se utilizaron células C6/36 HT (ATCC) amablemente proporcionadas por la Dra. Leticia Barrón, CINVESTAV, México DF. La línea celular C6/36 (Igarachi, 1978) es una clona obtenida de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya, aunque en estudios realizados (Kuno, 1985) se ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos tales como la AP61 (*aedes albopictus*) y las TRA-284. Algunas cepas de dengue son capaces de producir ECP (efecto citopatogénico) de tipo sincitial en las C6/36 pero este fenómeno no es característico de la línea.

1.1.2 **Condiciones de cultivo:** Medio de cultivo minimum essential medium (MEM) de Gibco suplementado al 7% con Suero bovino fetal (SBF), aminoácidos no esenciales al 1%, vitaminas 1%, 0.370 g/L de bicarbonato de sodio, penicilina 50U/mL y estreptomicina 50 µg/ml al 1%, a temperatura 34°C y atmósfera de CO₂ al 5% y 95% O₂.

- El protocolo de cultivo de la línea C6/36 HT se encuentra descrito en el anexo 1 (Protocolo de cultivo de células C6/36 HT)

1.2. Células BHK-21

- 1.2.1 **Línea celular:** El título viral fue evaluado mediante la formación de placas de lisis en células BHK-21 en monocapa. Estas células son derivadas de riñón de hámster bebé y son susceptibles a la infección por DENV.
- 1.2.2. **Condiciones de cultivo:** Las células fueron cultivadas en MEM al 5% SBF, penicilina (5×10^4 U/mL)-estreptomicina (50 ug/mL), 1 mL/L anfotericin B y 2 mM glutamina, aminoácidos no esenciales 1%, a 37°C y 5% CO₂. (El protocolo de cultivo de células BHK-21 se encuentra en el anexo 1 – propagación de células BHK-21)
- El protocolo de titulación de DENV se encuentra descrito en el anexo 1 – protocolo de titulación de DENV por dilución limitante).

1.3. Células Huh-7 parentales

- 1.3.1. **Línea celular:** Para los ensayos de inhibición la línea celular utilizada fue la línea Huh-7 parental la cual consiste en células tumorigénicas tipo epiteliales derivadas de hepatocarcinoma humano. Estas células son susceptibles a la infección por varios virus incluyendo en DENV. La utilización de esta línea celular para los ensayos de inhibición permite aprovechar sus propiedades de metabolismo completo de colesterol, respuesta a interferón, capacidad de procesamiento de fármacos.
- 1.3.2. **Condiciones de cultivo:** Las células fueron cultivadas en medio Advanced Dulbecco's modified Eagle medium (ADMEN) y suplementadas con 2 mM glutamina, 5% SBF, penicilina (5×10^4 U/mL)-estreptomicina (50 ug/mL), 1 mL/L anfotericina B, aminoácidos no esenciales 1% y cultivadas a 37 °C y 5% CO₂.

- El protocolo de propagación de células Huh-7 está descrito en la sección anexo 1 – protocolo de propagación de células Huh-7)

1.4. Cepa viral

1.4.1 Cepa viral Dengue Serotipo 2: La cepa viral utilizada fue Dengue 2 Nueva Guinea C (GenBank M29095). Esta cepa se caracteriza por presentar alta virulencia en células de mamíferos y producción de ECP observable al microscopio de luz.

- El protocolo de producción de DENV se encuentra descrito en el anexo 2 (Protocolo de producción de dengue virus).

2. REACTIVOS

2.1. Estatinas: Para los ensayos de inhibición farmacológica de la vía de colesterol se utilizaron estatinas en polvo grado HPLC obtenidas de Sigma Aldrich, St. Louis, MO. Todas las estatinas, excepto PRA, fueron diluidas en DMSO estéril a una concentración de 3 M. La PRA fue diluida en agua miliQ. Se prepararon soluciones 100 mM de estatinas en medio sin SBF para realizar los experimentos de inhibición.

2.2. Metil- β -ciclodextrina: La M β CD estéril, grado HPLC, fue obtenida de la compañía Sigma Aldrich, St. Louis, MO. El compuesto liofilizado fue suspendido en DMSO estéril para obtener una solución stock de concentración final de 300 mM. Se realizaron diluciones en medio de cultivo estéril sin SBF para los experimentos de inhibición.

2.3. Agente de transfección siPort NeoFX: Para la transfección de ARN de interferencia se utilizó el kit siPort NeoFX de Ambion, Austin, Tx. Se llevó a cabo una transfección inversa o reversa en la cual las células son transfectadas mientras se adhieren a la placa de cultivo. El protocolo de transfección se encuentra descrito en el anexo 2 bajo el título: Protocolo de Transfección siPort NeoFX.

2.4. ARN de interferencia (ARNi): El ARNi contra la enzima *HMGCR* fue adquirido en Thermo Fisher. “Silencer select pre-designed and validated siRNA – *HMGCR*”. Gene ID: 3156; Gene name: 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA-reductase; Homo sapiens. Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE:TMO). Para los experimentos de silenciamiento se utilizó el protocolo de transfección de siPort NeoFX (anexo 2).

2.5. Cebadores o primers: Para la amplificación de los fragmentos de interés por medio de PCR en tiempo real, se utilizaron los siguientes cebadores:

- Para amplificación del ARN de la enzima *HMGCR* se ordenaron cebadores o primers de la casa IDT (Integrated DNA Technologies)
- Primer 1: 5'- GAC GCA ACC TTT ATA TCC GTT T – 3'
- Primer 2: 5'- TTT TGA AAG TGC TTT CTC TGT ACC – 3'

3. ESTUCHES COMERCIALES Y EQUIPO

3.1. Ensayo de viabilidad celular MTT: Para la evaluación de la citotoxicidad de cada uno de los tratamientos se utilizó el ensayo de MTT de Roche Diagnostics, basado en el corte de

una sal de tetrazolio MTT en presencia de una agente acoplador de electrones. La sal insoluble de formazán producida, se solubiliza en un paso posterior. Células plaqueadas en cajas de 96 pozos fueron tratadas con los agentes a evaluar por los tiempos determinados (24, 48 y 72 h). Tras lo cual fueron incubadas con MTT por 4 h. Transcurrido el periodo de incubación, los cristales insolubles de la sal de formazán fueron formados. Después de una solubilización, el colorante fue escaneado mediante un lector de placa (Spectrofotometer ELISA reader, Biotek ELX 800) a 785 nm).

- 3.2. Ensayo de determinación de colesterol intracelular:** Para la determinación de colesterol intracelular se utilizó el kit “Cholesterol Fluorometric Assay Kit” de Cayman Chemicals, el cual por medio de la enzima colesterol oxidasa y el acoplamiento de peroxidasa de rábano y del compuesto fluorescente resorufina, mide la concentración de colesterol y esteroides de colesterol en la célula. Células Huh-7 línea parental, fueron crecidas en placas de 6 pozos. Fueron tratadas e infectadas conforme a cada condición experimental y posteriormente, una vez retirado el medio, lisadas con buffer de lisis (1.5 mM MgCl₂, Tris– HCl pH7.5 10mM, 10 mM NaCl, 1% IGEPAL) a los tiempos designados. El lisado celular fue analizado para la evaluación de colesterol en el equipo Microplate Fluorometer 9300-002 de Turner Biosystems, Inc. Sunny Valey, CA 94085 USA.
- El protocolo de evaluación de colesterol intracelular está descrito en la sección de anexos bajo el título (protocolo de evaluación de colesterol intracelular).

3.3. Ensayo de titulación viral: Se determinó la infectividad del DENV2 en las diferentes condiciones experimentales mediante el ensayo de unidades formadoras de placa (UFP), el

cual evalúa la capacidad de lisis celular del virus a analizar. Las células sembradas y sometidas a los diferentes tratamientos. Una vez cumplidos los periodos experimentales el sobrenadante de cada condición fue colectado en frío en tubos de 1 mL (Para la mayoría de los experimentos el volumen de sobrenadante tras la aplicación y remoción de los tratamientos era de 500 μ L). Una vez colectado el sobrenadante era almacenado a -80°C para su posterior evaluación.

- El protocolo de titulación de virus se encuentra descrito en la sección de anexo 2 bajo el título “Protocolo de titulación de DENV por dilución limitante”.

3.4. Ensayo de PCR en tiempo real

El ensayo de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo STEP One 7500 Fast de Applied Biosystems®. Una vez completados los tratamientos de cada condición experimental y cumplidos los tiempos, se realizó una extracción de ARN total con TRIzol®, seguida de la separación con cloroformo y precipitación con Isopropanol en frío. La pastilla se resuspendió en agua DEPC con RNase out. El volumen final de solución de ARN fueron 30 μ L. El ARN se sometió a una retro-transcripción utilizando la retrotranscriptasa M-MLV y cebadores aleatorios. Una vez obtenido el cDNA, el mismo se cuantificó en el equipo Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermofisher. Las muestras se llevaron a una concentración final de 25 ng/ μ L en agua DEPC. Seguidamente se llevó a cabo una PCR en tiempo real por el método SYBR Green con primers específicos para cada gen (HMGCR – gen blanco; GAPDH – control endógeno y ACTINA – control endógeno). El volumen de reacción fue de 25 μ L para cada muestra, y se realizaron los

cálculos basados en el $\Delta\Delta CT$ de las muestras contra los genes de expresión endógena estable.

- Los detalles específicos y condiciones experimentales se encuentran descritos en la sección de anexos bajo los títulos; protocolo de RT-PCR y protocolo de PCR en tiempo real.

3.5.Evaluación de la expresión de genes de respuesta antiviral

El análisis de la expresión de genes de respuesta antiviral se llevó a cabo mediante el uso de la plataforma RT² Profiler PCR Arrays for antiviral pathway assessment (Cat. PAHS-122Z) de QIAGEN. El formato utilizado fue en placa de 96 pozos el cual permite el análisis de 84 genes de respuesta antiviral celular y 5 genes “house keeping”. Adicionalmente la placa contiene un pozo a manera de control de contaminación con DNA, 3 pozos control para retrotranscripción y 3 pozos de control positivo de PCR. Los genes analizados fueron:

- Vía de señalización Toll-Like Receptor: *CTSB*, *CTSL*, *CTSS*, *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *CHUK* (*IKK α*), *FOS*, *IKBKB*, *IRAK1*, *IRF3*, *IRF5*, *IRF7*, *JUN*, *MAP2K1* (*MEK1*), *MAP2K3* (*MEK3*), *MAP3K7* (*TAK1*), *MAPK1* (*ERK2*), *MAPK14* (*p38 MAPK*), *MAPK3* (*ERK1*), *MAPK8* (*JNK1*), *MYD88*, *NFKB1*, *NFKB1A*, *RELA*, *RIPK1*, *SPP1*, *TBK1*, *TICAM1* (*TRIF*), *TNF*, *TRAF3*, *TRAF6*, *CCL3* (*MIP-1A*), *CCL5* (*RANTES*), *CD40* (*TNFRSF5*), *CD80*, *CD86*, *CXCL10* (*IP-10*), *CXCL11* (*I-TAC/IP-9*), *CXCL9* (*MIG*), *IFNA1*, *IFNB1*, *IL12A*, *IL15*, *IL1B*, *IL6*.
- Vía de señalización NOD-Like Receptor: *AIM2*, *CARD9*, *CASP1* (*ICE*), *HSP90AA1*, *MEFV*, *NLRP3*, *NOD2*, *OAS2*, *PSTPIP1*, *PYCARD*, *PYDC1*, *SUGT1*.
- Vía de señalización RIG-I-Like Receptor: *CYLD*, *DAK*, *DDX58*, *IFIH1* (*MDA5*), *ISG15* (*G1P2*), *TRIM25*, *ATG5*, *AZI2*, *CASP10*, *CASP8*, *CHUK* (*IKK α*), *DDX3X*, *FADD*, *IKBKB*,

IRF3, IRF7, MAP3K1, MAP3K7 (TAK1), MAPK14 (p38 MAPK), MAPK8 (JNK1), MAVS, NFKB1, NFKB1A, PIN1, RELA, RIPK1, CXCL10, IFNA1, IFNB1, IL12A, IL12B, IL8.

- Vía de señalización Interferon Type I: *IFNA1, IFNA2, IFNAR1, IFNB1, STAT1, APOBEC3G, IL15, ISG15, MX1, TLR3.*

Una vez completados los experimentos el ARN total de cada condición fue extraído utilizando el kit “QIAGEN RNAeasy Plus Mini Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica permite la obtención de ARN de alta pureza, la cual es requerida para el ensayo de expresión. Una vez extraídas las muestras estas fueron retro-transcritas y amplificadas por PCR en tiempo real, utilizando el RT² First strand kit y RT² PCR array respectivamente. Para la retrotranscripción se utilizó la técnica del protocolo M-MLV. La PCR en tiempo real se llevó a cabo bajo condiciones estándar de trabajo.

- El protocolo de extracción de ARN, conversión a cDNA y amplificación por PCR en tiempo real, está descrito en el anexo 2 bajo el título “Protocolo de amplificación PCR array”.

4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

4.1. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de las estatinas y la M β CD fue determinada mediante el ensayo de viabilidad MTT (Roche Diagnostics, France). El ensayo está basado en el corte de la sal de tetrazolium MTT en presencia de un reactivo de acoplamiento de electrones. La sal insoluble producida se solubiliza en un paso posterior para luego ser determinada por espectrofotometría. El valor de absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas. Células Huh-7

fueron cultivadas en placas de 96 pozos y tratadas a diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar en los periodos determinados. El protocolo de evaluación de viabilidad MTT se describe en el anexo 2 (protocolo MTT).

4.2. Ensayo de inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol

La síntesis de colesterol fue inhibida en células Huh-7, mediante la acción farmacológica de 5 estatinas: lovastatina (LOV), atorvastatina (ATO), pravastatina (PRA), fluvastatina (FLU) y simvastatina (SIM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). El tratamiento fue aplicado de dos maneras. En un subgrupo de células, el tratamiento se aplicó 24 previo a la infección (tratamiento pre-infección) y en el sub grupo restante se aplicó el tratamiento 12 post infección. En el primer esquema, tratamiento pre-infección, células Huh-7 fueron cultivadas en condiciones normales de cultivo hasta obtener el número deseado para los experimentos. Se plaquearon las células en cajas de 12 pozos, 160,000 células por pozo y tras 24 h de propagación el medio fue removido y sustituido con medio conteniendo la concentración de estatinas deseada. (El medio de las células control fue sustituido con medio nuevo). Las células se expusieron a la acción de las estatinas por 24 h tras las cuales el medio fue retirado y se procedió a la infección con DENV2. Para ello se agregó medio sin suero a las células (200 μ L para placas de 12 pozos) y se procedió a la infección por 2 h en agitación. Transcurrido el tiempo se completó el volumen del pozo con medio fresco 2% SBF y a partir de allí se contabilizaron los tiempos. En el esquema de tratamiento post infección, se realizó la infección de las células y tras 12 h se renovó el medio con medio fresco conteniendo las estatinas a las concentraciones deseadas. Tras 24h de tratamiento se retiró el medio y se agregó medio fresco. A partir de allí se contabilizaron los tiempos de tratamiento.

4.3. Ensayo de inhibición genética de la síntesis de colesterol

Para los ensayos de inhibición genética de la vía de colesterol, se llevó a cabo el silenciamiento de la enzima Hidroximetil-glutaril-CoEnzima A-reductasa (*HMGCR*). Células Huh-7 fueron plaqueadas en cajas de 12 pozos (160,000 cel/pozo). La transfección del ARNi-*HMGCR*, el ARNi-*GAPDH* y el ARNi-Control Negativo se llevó a cabo al momento del plaqueo celular de acuerdo al protocolo ya descrito. 24 h después de plaqueadas, a las células se les retiró el medio de cultivo y se substituyó con medio sin SBF a medio volumen (200 μ L para placas de 12 pozos). Se procedió a la infección con DENV2 por 2 h en agitación. Transcurrido el tiempo se completó el medio con medio de cultivo fresco al 2% en SBF. A partir de este momento se contabilizaron 48 h y se procedió al análisis de las muestras.

4.4. Ensayo de inhibición química de la síntesis de colesterol

La inhibición química del colesterol se llevó a cabo utilizando M β CD. Este agente secuestrador de colesterol ejerce su efecto extrayendo el colesterol de las membranas. Para los experimentos de inhibición células Huh-7 fueron plaqueadas en cajas de 12 pozos (160,000 cel/pozo). Tras 24 h de crecimiento, el medio fue retirado y substituido con medio nuevo conteniendo la concentración de M β CD indicada. Tras 24 h de acción, el compuesto fue retirado cambiando el medio de cultivo por medio nuevo sin SBF a volumen medio para realizar la infección con DENV2. Se permitió la infección por 2 h en agitación tras lo cual se completó el volumen del pozo con medio nuevo al 2% en SBF. Tras 48 h se llevaron a cabo las evaluaciones correspondientes.

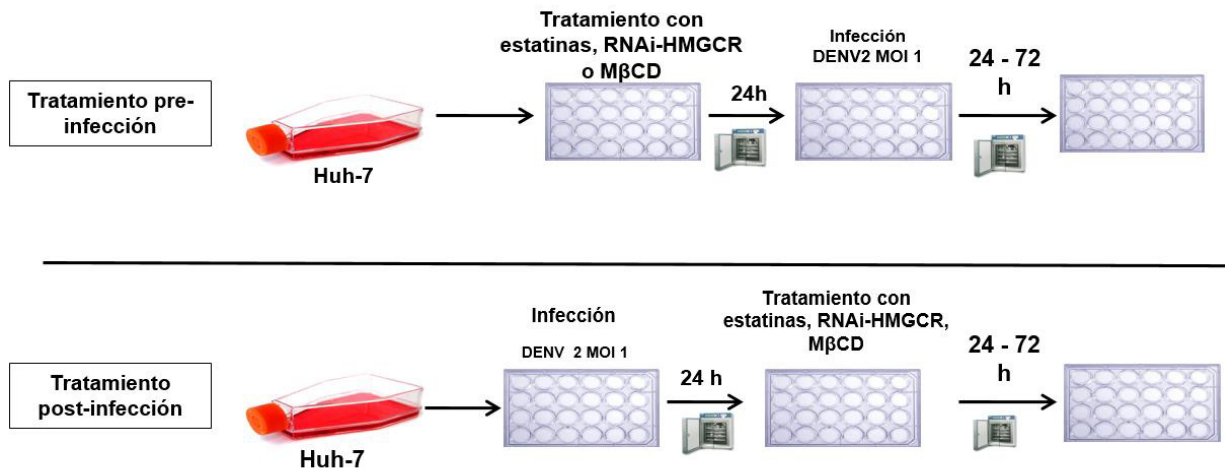


Figura 9: Esquemas de tratamiento in vitro. El esquema de tratamiento in vitro se dividió en 2 aproximaciones experimentales. En la primera las células Huh-7 fueron plaqueadas en cajas de 12 pozos, incubadas 24 h e infectadas con DENV a una MOI de 1. Pasadas 24 h de infección las células fueron tratadas con estatinas o MβCD a las concentraciones indicadas. El tratamiento se permitió por los tiempos definidos y se colectó la muestra para análisis. La segunda aproximación de tratamiento consistió en el tratamiento pre infección en el cual las células Huh-7 fueron plaqueadas en cajas de 12 pozos, incubadas por 24 h y tratadas con estatinas y MβCD a las concentraciones indicadas, se permitió el efecto de los tratamientos por 24 h tras las cuales las células fueron infectadas con DENV a una MOI de 1. Cumplidos los tiempos de infección se colectaron las muestras para su análisis.

Resultados

1. ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL Y PERFIL CITOTÓXICO

1.1. Producción de DENV de alto rendimiento

El DENV es capaz de infectar una gran variedad de células de diferente estirpe presentando a su vez tasas de replicación variables en función de la línea celular, tiempo de infección, serotipo viral, pH del medio y método de concentración de partículas virales. En la actualidad existen métodos para la obtención de partículas virales de DENV para fines de investigación y diagnóstico. Sin embargo las características del virus hacen complicada y laboriosa la obtención de títulos virales. Mediante modificación de la línea celular, métodos de cosecha y condiciones de purificación, se logró optimizar el rendimiento en cuanto al título del DENV de una manera simple y con menos requerimientos técnicos en el procedimiento, logrando mantener la producción de DENV a altos títulos.

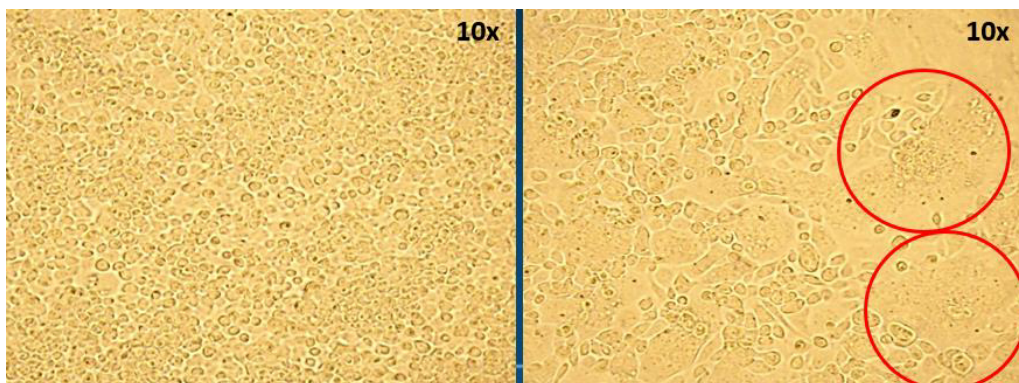


Figura 10: Evaluación del efecto citopático del DENV sobre células C6/36 HT (Producción de virus de alto rendimiento). Micrografías de células C6/36 HT. Infectadas 48 h post infección con DENV2 a una MOI de 2 (Derecha); Control sin infección (izquierda). En círculos se observan sincitios de lisis por la infección activa.

En la figura 10 se presenta una micrografía de células C6/36 HT. Izquierda: Células sin infección y Derecha: Células Infectadas con DENV2: MOI 2, 48 h post infección. En las áreas marcadas se observan los sincitios de lisis, los cuales indican un título viral apto para realizar la cosecha de virus. Los sincitios de lisis aparecen aproximadamente entre 48 y 72 h post-infección en esta línea celular adaptada para este fin. Mediante este procedimiento se logró la producción de 9 lotes de DENV. Siete de ellos de DENV serotipo 2 y dos de DENV serotipo 1 (Fig. 10). Se evaluó el título viral mediante el ensayo de UFPs y se obtuvieron títulos de hasta 10^9 lo cual es considerado un título de alta eficiencia para el DENV. Cada ciclo de producción, a partir de la infección primaria para la producción de virus semilla hasta la obtención, concentración y purificación final da como resultado un lote viral el cual es nombrado de acuerdo a la fecha de obtención, titulado para evaluar su capacidad infectiva y almacenado para su uso posterior en experimentos o para la producción de más lotes. A continuación se enumeran los lotes virales obtenidos en este trabajo:

- | | |
|---|---|
| - Lote DENV2_25ene2013: 1.4×10^8 | - Lote DENV2_Feb2013: 4.6×10^3 |
| - Lote DENV2_26mar2013: 1.1×10^4 | - Lote DENV2_19abr2013: 2.2×10^6 |
| - Lote DENV2_28abr2013: 2.8×10^5 | - Lote DENV2_17jun2013: 4.6×10^6 |
| - Lote DENV2_28jun2013: 7.6×10^7 | - Lote DENV2_30jun2013: 3.9×10^6 |
| - Lote DENV1_30ago2013: 2.3×10^5 | - Lote DENV1_06sep2013: 3.3×10^5 |

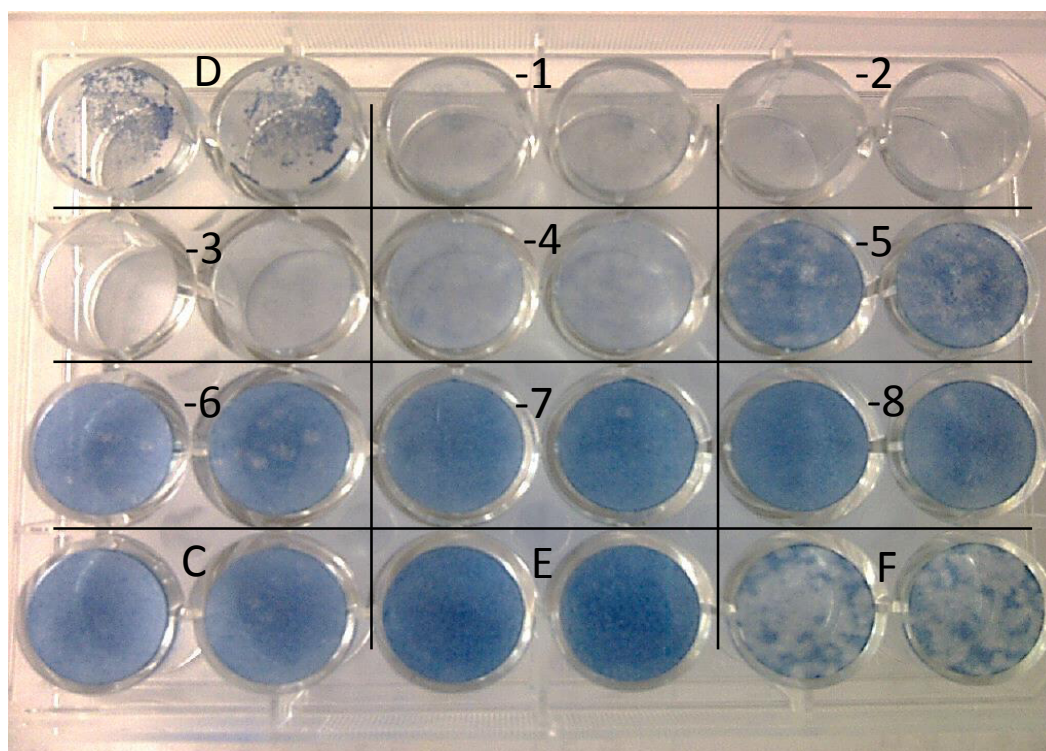


Figura 11: Ensayo de UFPs. Se llevó a cabo la evaluación del título viral de los lotes obtenidos a partir de la técnica de producción viral de alto rendimiento. En la imagen se muestra una placa de 24 pozos en donde se plaquearon células BHK-21 las cuales fueron infectadas con diluciones seriadas de DENV 2. El título viral obtenido: 1.4×10^8 UFPs/mL. Código: D= Control de virus a titular sin dilución; -1 a -8 = Dilución seriada de muestra a titular; C= Control Negativo; E= Lote DENV2 inactivado con luz UV; F= Lote DENV2 Título conocido

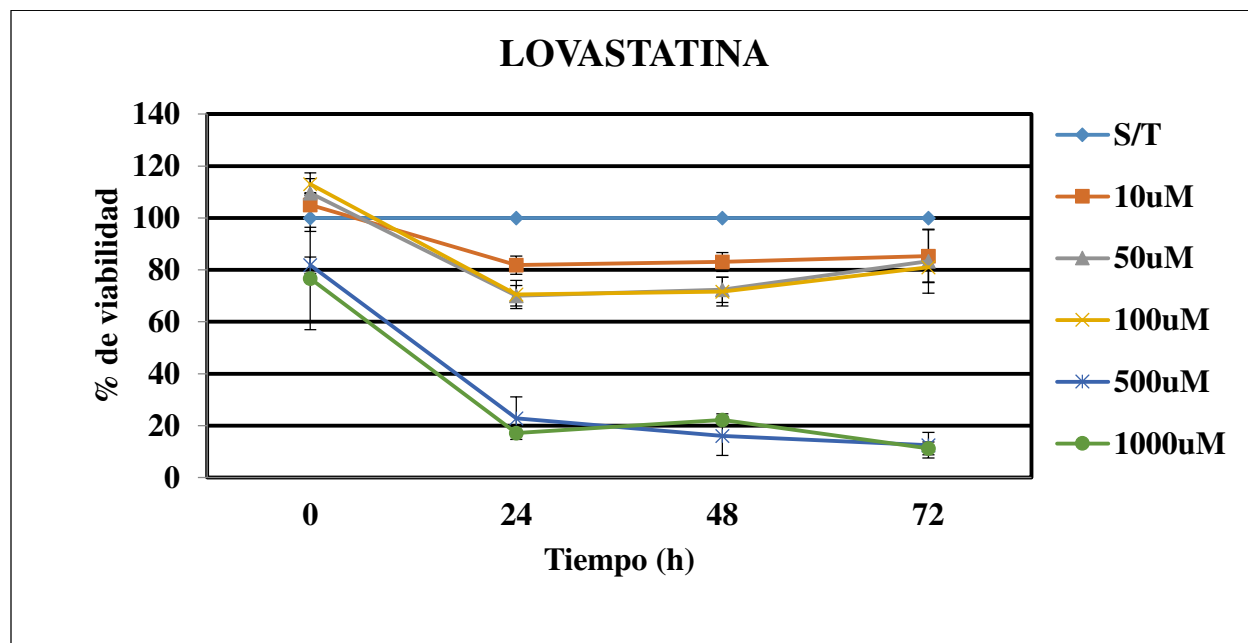
1.2.Evaluación de citotoxicidad de tratamientos experimentales

La citotoxicidad de las estatinas (LOV, PARA, ATO, FLU y SIM) y de la M β CD fue evaluada mediante el ensayo de MTT (Fig. 12). Se ha reportado que las estatinas poseen propiedades oncolíticas *in vitro*, debido a lo cual era de suma importancia evaluar su efecto en nuestro sistema experimental ya que se utilizó la línea celular Huh-7 para los experimentos de inhibición. De esta manera se determinaron concentraciones no citotóxicas de los compuestos a utilizar en nuestro sistema. Se eligió un rango de concentraciones a evaluar, en base a lo reportado en el arte previo. Como resultado se decidió trabajar con las siguientes concentraciones de cada compuesto:

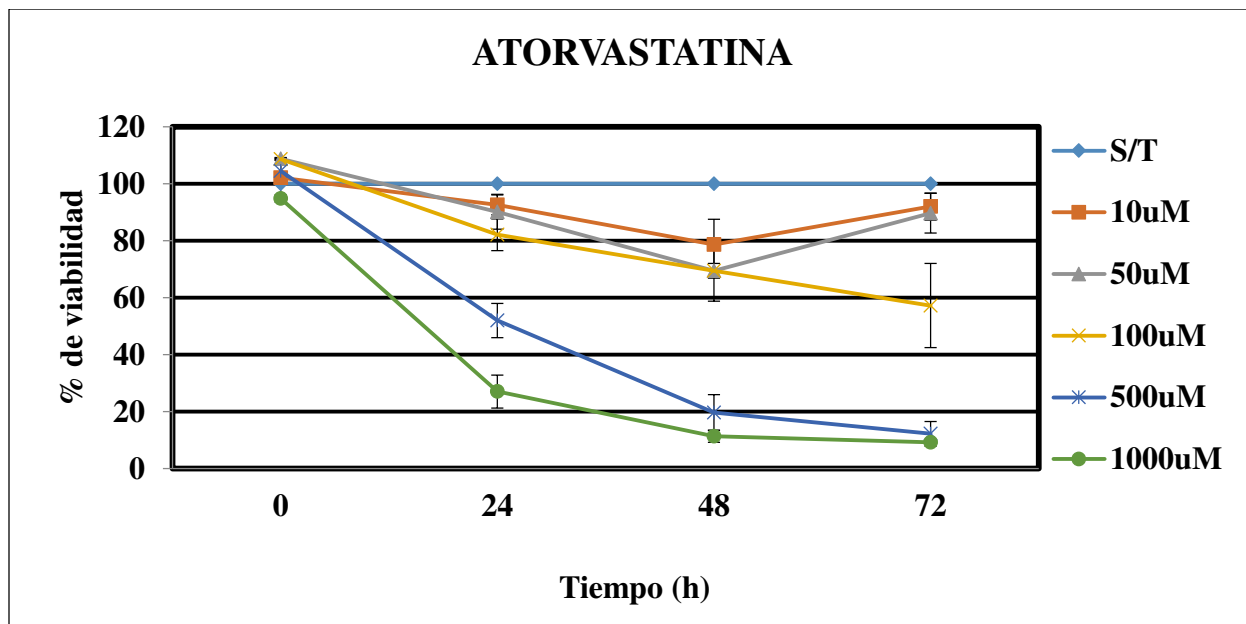
Nombre	Rango [](μM)	[] Óptima (μM)
- Lovastatina (LOV):	10 – 30	20
- Atorvastatina (ATO):	10 – 20	10
- Pravastatina (PRA):	50 – 80	50
- Fluvastatina (FLU):	10 – 20	10
- Simvastatina (SIM):	10 – 30	20
- Metil-β-Ciclodextrina (MβCD)	100 – 1000	500

A continuación se presentan los gráficos de viabilidad celular de cada uno de los tratamientos aplicados. Con base en estos resultados se determinaron las concentraciones de trabajo para los ensayos de inhibición de la vía de colesterol. Cada gráfico representa un compuesto probado con tres tiempos de tratamiento y a cinco diferentes concentraciones.

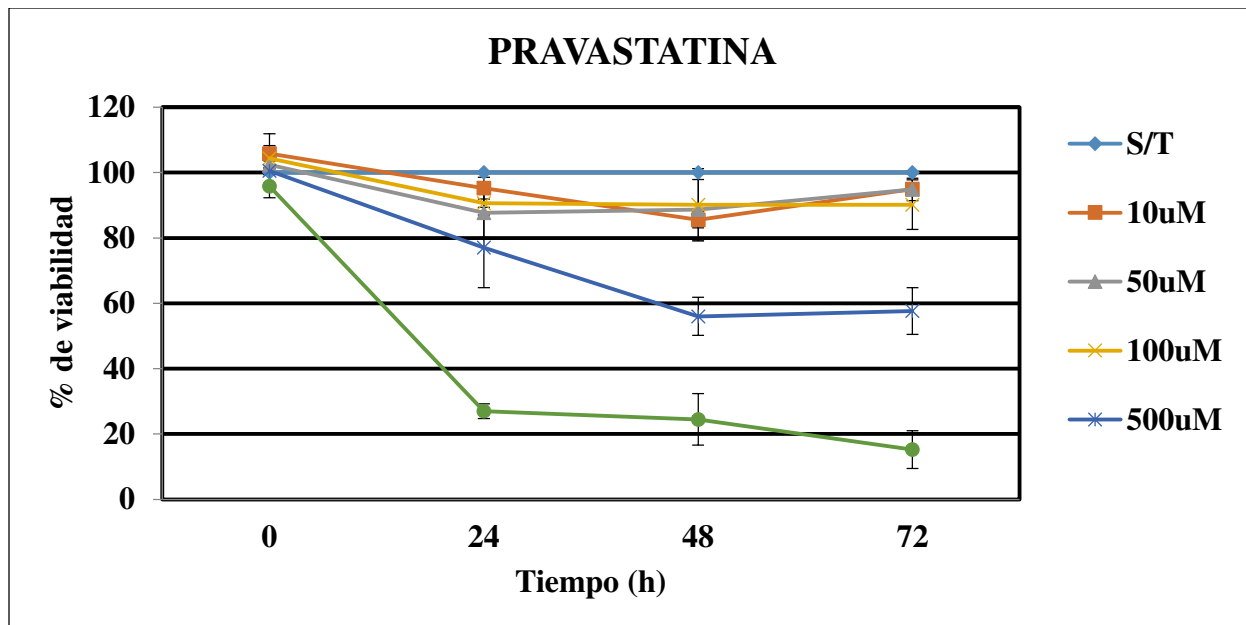
a)



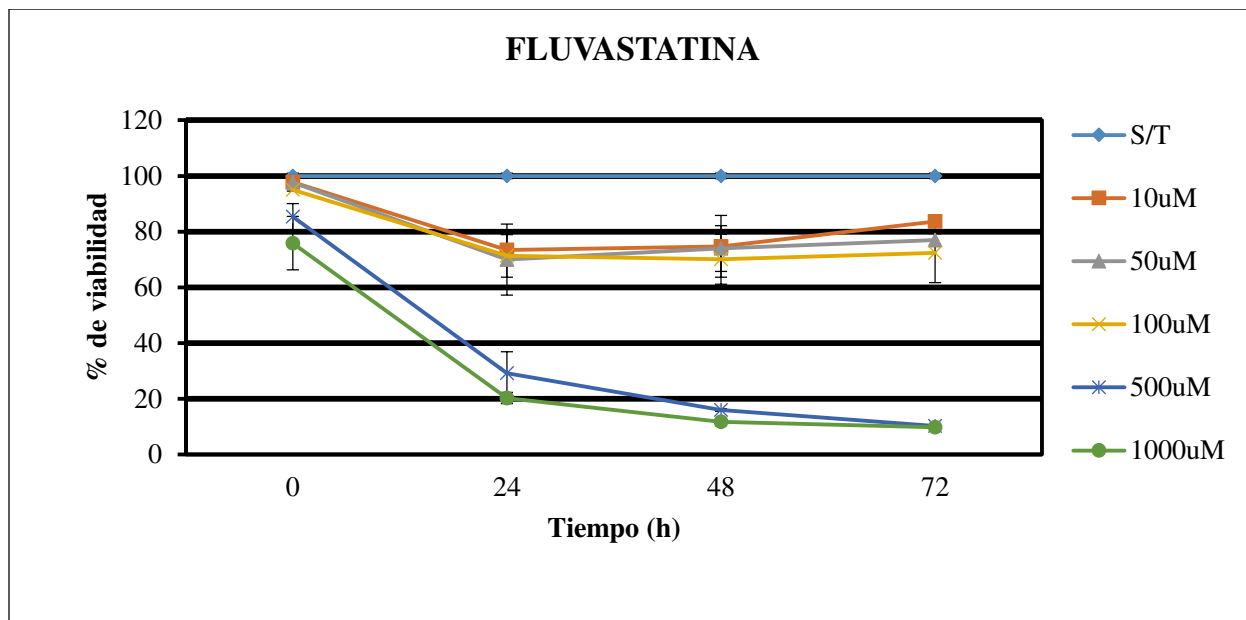
b)



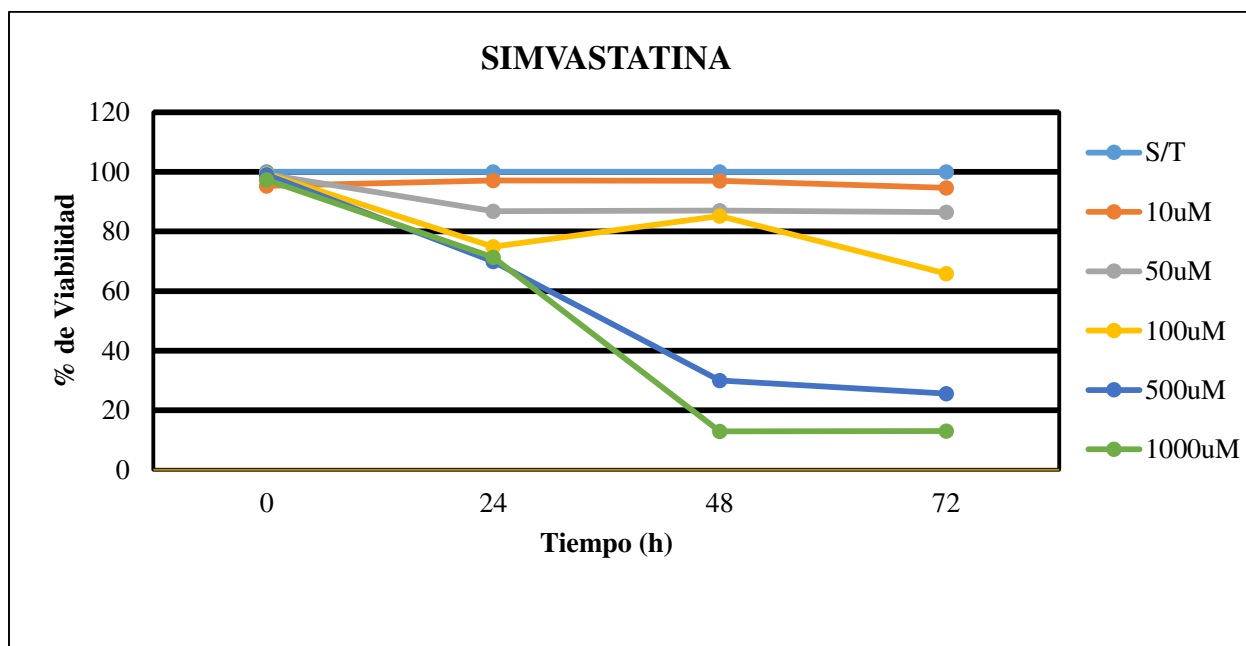
c)



d)



e)



f)

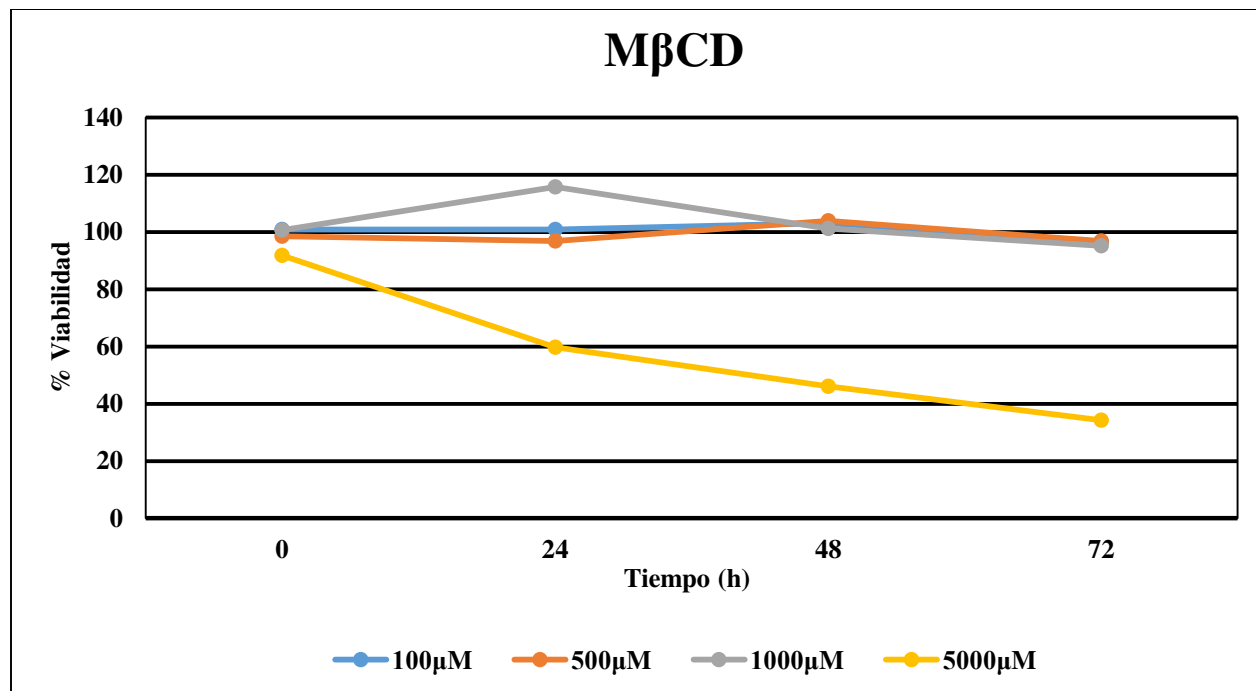


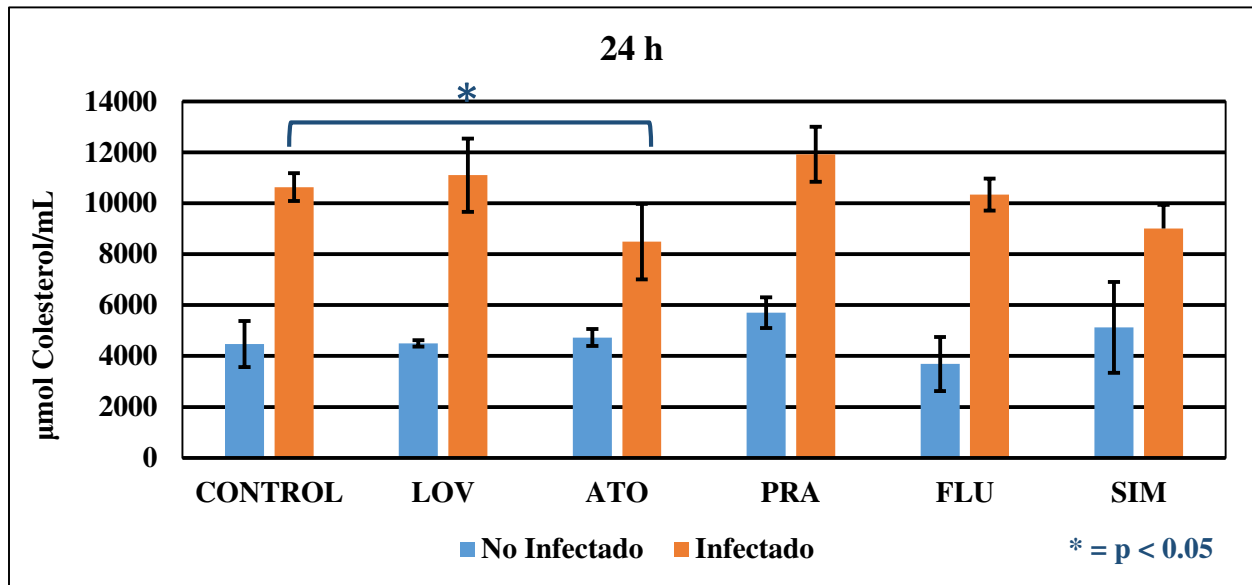
Figura 12. Evaluación de perfil citotóxico de los tratamientos experimentales. Células Huh-7 fueron cultivadas por 24 h tras las cuales se aplicaron los diferentes tratamientos experimentales: a) LOV, b) ATO, c) PRA, d) FLU, e) SIM y f) MβCD a las concentraciones indicadas. Cumplidos los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) se evaluó la viabilidad celular con el estuche comercial MTT de Roche. El porcentaje de viabilidad se calculó en base al resultado de células sin tratamiento el cual fue tomado como 100 por ciento.

2. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA Y GENÉTICA DE LA SÍNTESIS Y DEPLECIÓN QUÍMICA DE COLESTEROL

2.1. Inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol: tratamiento con estatinas

La inhibición farmacológica de la síntesis de colesterol se llevó a cabo mediante el tratamiento con estatinas. Estos inhibidores competitivos de la *HMGCR* fueron aplicados en condiciones libres de infección y en presencia del DENV2. Para cada condición se compararon los valores de colesterol contra un control ya sea sin infección o control infectado con DENV2 sin tratamiento. El tratamiento con estatinas se llevó a cabo durante 24 y 48 h, tras las cuales el extracto celular fue

a)



b)

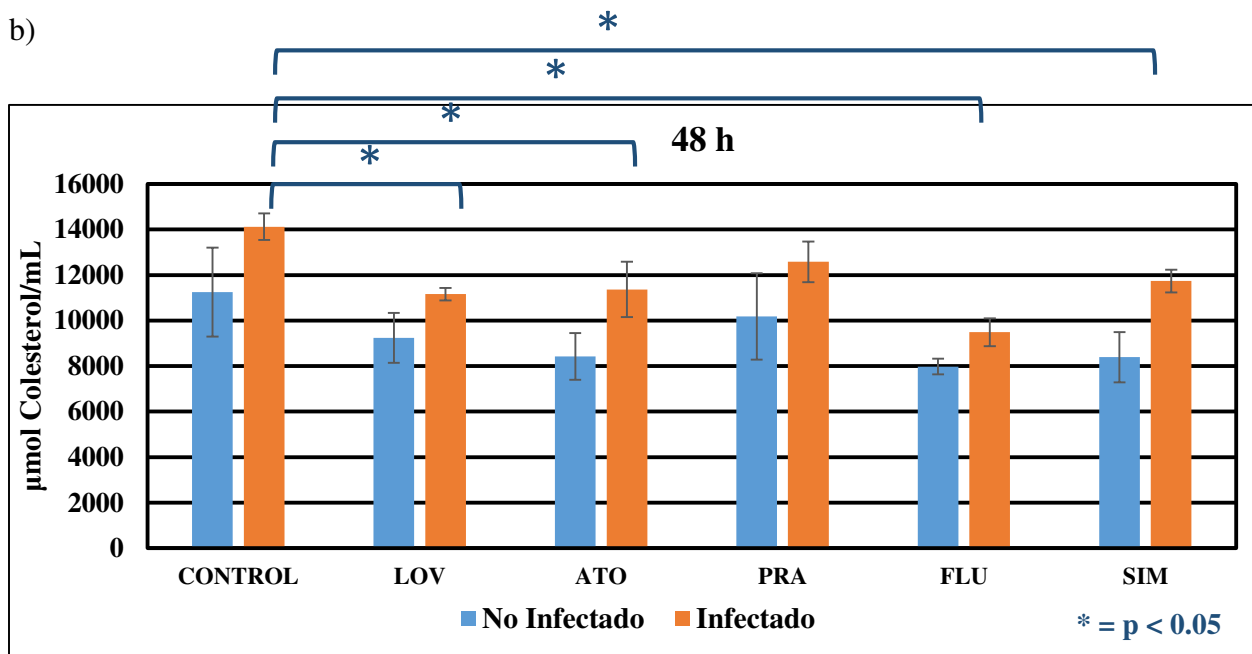


Figura 13: Inhibición farmacológica de la vía de síntesis de colesterol. Células Huh-7 fueron cultivadas por 24 h, luego infectadas con DENV 2 (barras azules) por otras 24 hrs tras las cuales se aplicaron los diferentes tratamientos experimentales: LOV (20μM), ATO (10μM), PARA (50μM), FLU (10μM) y SIM (20μM) a las concentraciones indicadas. Cumplidos los diferentes tiempos (24 y 48 h) se evaluaron los niveles de colesterol intra-celular con el estuche comercial Cayman fluorimetric cholesterol assay kit. Los niveles de colesterol se expresan en μmoles/mL.

analizado para medir los niveles de colesterol. Nuestros resultados indican que las 5 estatinas utilizadas tienen un efecto inhibidor del colesterol, como era de esperarse. Este efecto es diferencial, presentándose estatinas con mayor y menor capacidad inhibitoria. En la figura 13 puede apreciarse la representación gráfica de los niveles de colesterol en células tratadas con cinco diferentes estatinas. Tras 24 h de tratamiento cuatro de las cinco estatinas no tuvieron efecto significativo sobre los niveles de colesterol al compararlas contra el control sin tratamiento. ATO redujo en un 22% los niveles de colesterol pero solo en células infectadas. Sin embargo, a 48 h post-tratamiento, FLU y ATO presentaron los mayores niveles de inhibición con un 35 y 30 % respectivamente, seguidas de LOV y SIM con un 25 y 20% y por ultimo PRA con un 8 %. De manera interesante se observó que los niveles de colesterol de células infectadas con DENV2, presentaron niveles de colesterol mucho más elevados que células no infectadas, siendo esta diferencia significativa entre ambos grupos.

2.2. Inhibición genética de la vía de síntesis de colesterol: tratamiento con ARNi-*HMGCR*

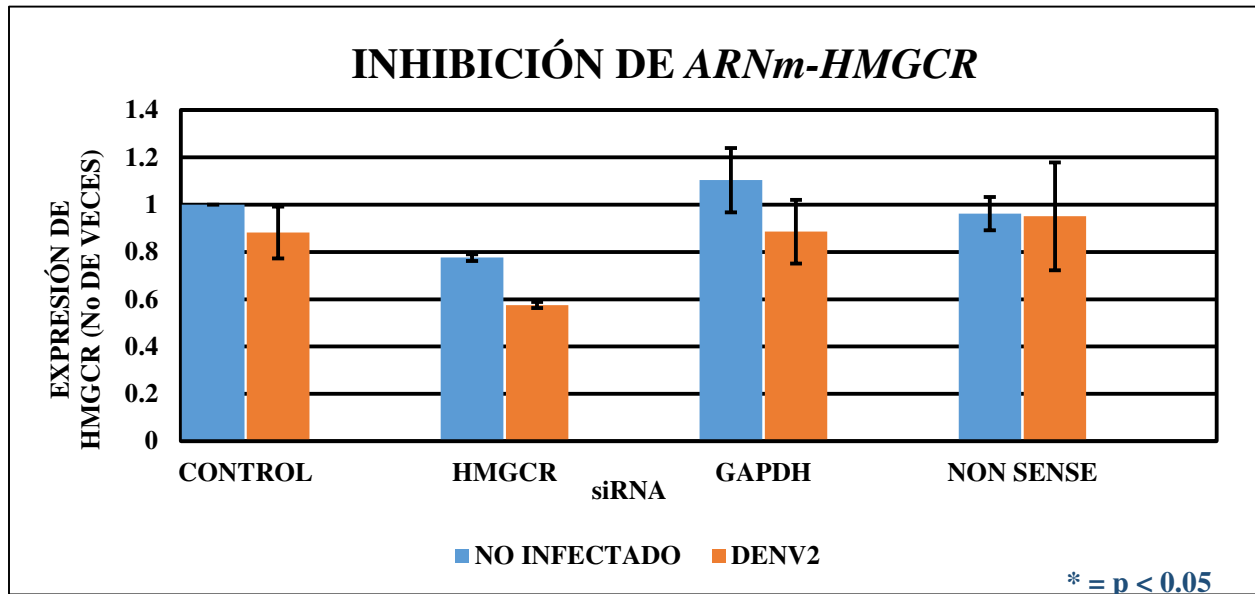
La inhibición genética de la síntesis de colesterol se efectuó mediante el silenciamiento del ARN mensajero de la enzima *HMGCR* con un ARN de interferencia ARNi-*HMGCR*. El bloqueo de la vía de colesterol por medio de ARNi ha sido empleado en estudios previos para evaluar la relación de esta vía con el ciclo de replicación de múltiples virus, incluyendo DENV y otros flavivirus. En este trabajo se evaluó el efecto del bloqueo genético de la vía y se comparó con otro tipo de tratamiento inhibitorio (inhibición farmacológica y química). Primeramente se evaluó la efectividad y especificidad del silenciamiento de nuestro sistema. Se transfectaron las células con ARNi-*HMGCR* y con ARNi-*GAPDH* y ARNi sin sentido como controles. Se comprobó una alta especificidad de nuestro ARNi al ser el único en demostrar efecto sobre los niveles de ARNm de

la *HMGCR* al evaluar el ARN total de cada condición por PCR en tiempo real 48 h post-transfección. (Fig. 14 a) Los tratamientos con ARNi-*GAPDH* y ARNi-sin sentido no tuvieron efecto sobre los niveles del mensajero de la *HMGCR* tanto en células sin infección como en células infectadas con DENV2 a una M.O.I. de 1. (Fig. 14b). El tratamiento con el ARNi-*HMGCR* redujo levemente los niveles intracelulares de colesterol en células no infectadas. Sin embargo, en el grupo de células infectadas con DENV2 a una M.O.I. de 1, no se observó diferencia significativa en los niveles intracelulares de colesterol en comparación con el control sin tratamiento a 48 h post-infección.

2.3. Inhibición química del colesterol: tratamiento con M β CD

Teniendo como objetivo el determinar los diferentes mecanismos moleculares que explican la relación del colesterol y el DENV, se llevó a cabo el experimento de inhibición química del colesterol utilizando el agente secuestrador de colesterol M β CD. La M β CD ha sido utilizada en varios estudios de inhibición comprobando su potencial antiviral y virucidal. Para nuestro experimento de inhibición se cultivaron células Huh-7 línea parental y tras 24 h de cultivo, fueron tratadas con M β CD por 24 h a la dosis óptima determinada en los ensayos de inhibición. Cumplidas las 24 h, las células fueron infectadas con DENV2 a una M.O.I. de 1. El progreso de la infección se permitió por 48 h, tras las cuales se evaluaron los niveles de colesterol intracelular. La figura 14 muestra como el tratamiento con M β CD presentó un moderado efecto de inhibición de colesterol al tiempo medido (Fig.15). Nuevamente, los niveles de colesterol de las células infectadas con DENV2, presentaron niveles elevados de colesterol en comparación con su contraparte sin infección

a)



b)

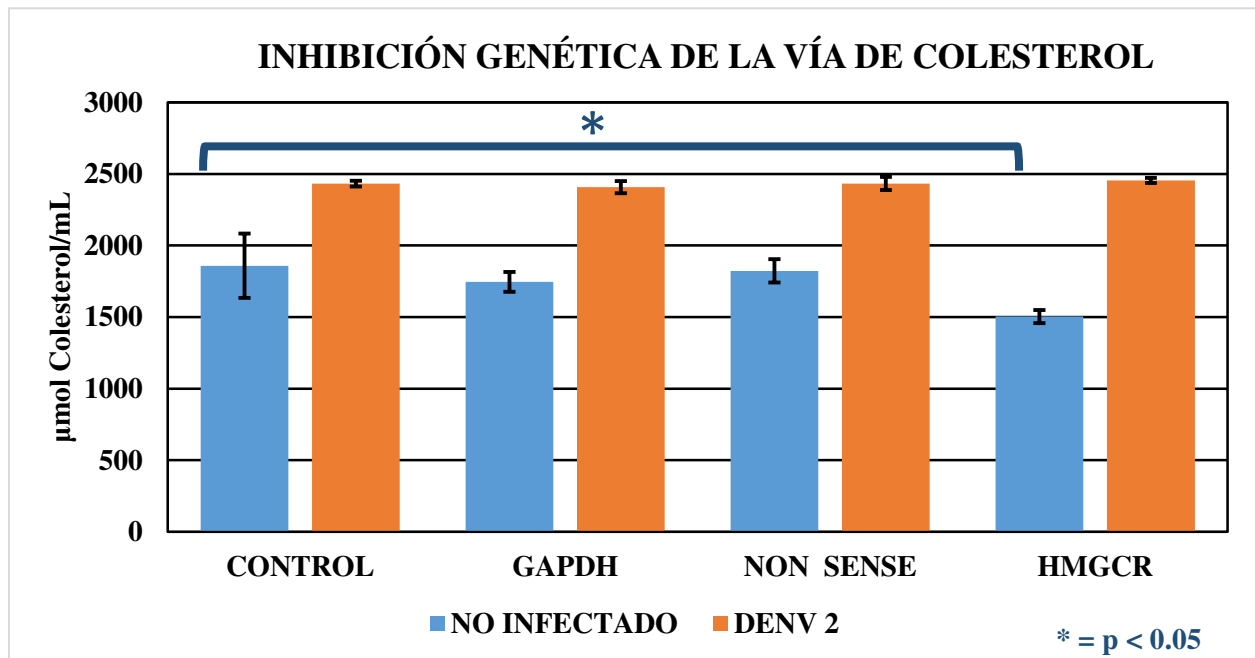


Figura 14: Inhibición genética de la vía de síntesis de colesterol. Representación gráfica del efecto del bloqueo genético de la vía de colesterol. Determinación de la efectividad y especificidad del ARNi-HMGCR por medio de PCR en tiempo real del ARN total de células Huh-7 no infectadas e infectadas con DENV 2 a una M.O.I. de 1, transfectadas con ARNi-HMGCR y de la inhibición genética de la síntesis de colesterol mediante la medición de los niveles intracelulares de colesterol. ARNi-GAPDH y ARNi-NON SENSE se utilizaron a manera de control. La transfección se llevó a cabo al momento del plaqueo celular, 12 h después se realizó la infección de un sub-grupo de células. 48 h post-infección se evaluaron los niveles de a) *ARN^m-HMGCR* y b) colesterol intracelular.

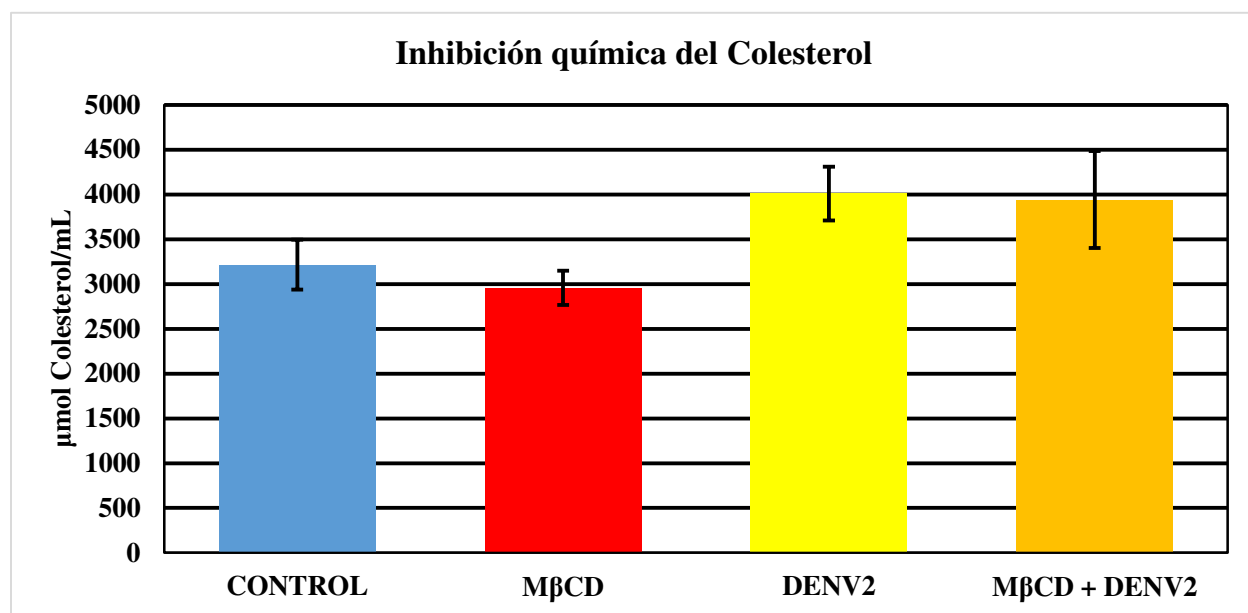


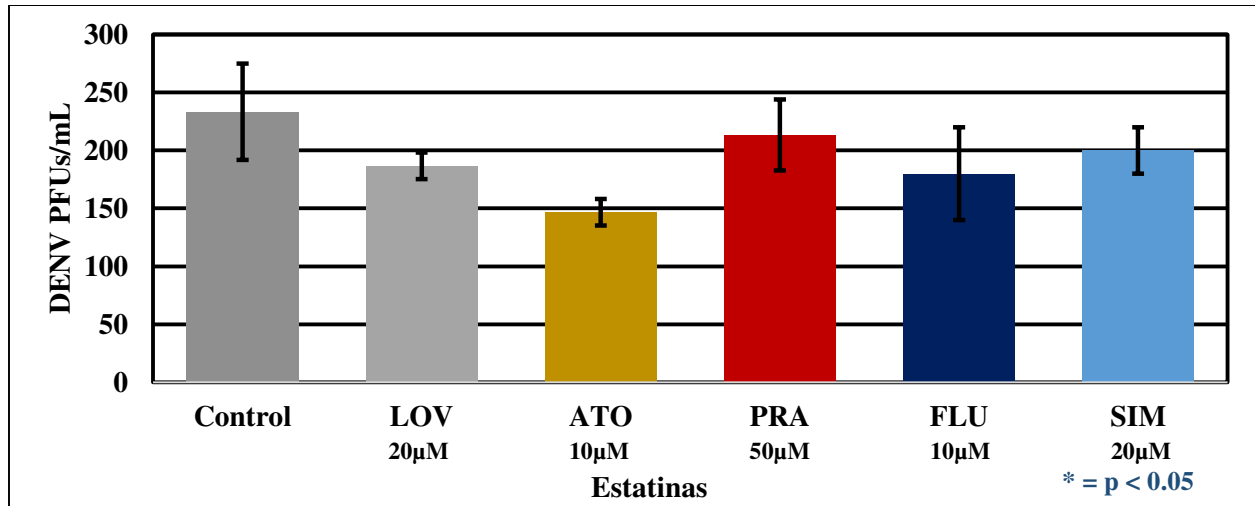
Figura 15: Inhibición química del colesterol. Representación gráfica del efecto del bloqueo químico del colesterol. Células Huh-7 fueron plaqueadas en cajas de 12 pozos y cultivadas por 24 h. Transcurrido ese tiempo se aplicó el tratamiento con MβCD a una concentración de 500 μM. Después de 24 h de tratamiento el sobrenadante fue cambiado y las células fueron infectadas con DENV2 a una MOI de 1, 48 h después se evaluaron los niveles de colesterol intracelular.

3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL POR INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL

Para evaluar el efecto antiviral de la inhibición farmacológica (estatinas), genética (ARNi-*HMGCR*) y química (MβCD) de la síntesis de colesterol sobre el DENV2, células Huh-7 línea parental fueron tratadas con LOV (20 μM), ATO (10 μM), PRA (50 μM), FLU (10 μM) y SIM (20 μM); con ARNi-*HMGCR* (150 nM) y con MβCD (500 μM); concentraciones basadas en los ensayos de citotoxicidad. Las células fueron tratadas pre y post infección para los ensayos con estatinas y solamente pre-infección para los ensayos con ARNi y MβCD. Las células fueron infectadas con DENV 2 cepa New Guinea a una M.O.I. de 1. Las estatinas poseen la propiedad de inhibir de manera competitiva la enzima *HMGCR*, enzima clave en la vía de síntesis de colesterol.

De igual manera la inhibición genética de la vía genera como resultado potencial una reducción en la traducción y subsecuente actividad de la enzima, resultando en la reducción de los niveles de colesterol intracelular. Así mismo, el tratamiento con M β CD, representa un método directo de inhibición de colesterol. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la modulación de la vía de síntesis de colesterol sobre la replicación del DENV2 tanto en estadios tempranos de la infección (Entrada y fusión viral) como en estadios tardíos de la misma (traducción, replicación y ensamblaje), utilizando tres diferentes aproximaciones de inhibición. Se ha reportado que la replicación del DENV comienza entre 12 y 16 h post entrada del virus a la célula [19]; por tal motivo las células fueron tratadas 24 h pre infección y 12 h post infección. Se colectó el sobrenadante de cada condición 48 h transcurrida la infección para la evaluación de infectividad viral con el ensayo de UFPs. De igual manera se evaluó el efecto citopático de la infección por DENV en cada una de las condiciones de tratamiento. Nuestros resultados indican que en estadios tempranos de la infección las estatinas mostraron un efecto antiviral leve sobre la infectividad del DENV2, en donde solo LOV, ATO y FLU con porcentajes de inhibición de 20%, 40% y 20% respectivamente. Fig. 16 a. Por otro lado El tratamiento en estadios tardíos de la infección, mostraron un efecto significativo en cuanto a la inhibición del DENV2 siendo el tratamiento más efectivo el de FLU (75%), ATO (72%) y LOV (68%). PARA y SIM mostraron un efecto moderado en este conjunto de experimentos Fig. 16 b. Los resultados de la evaluación del efecto citopático del DENV sobre las células, coincide con los resultados de titulación viral (Fig. 17 a y b). El tratamiento con ARNi-*HMGCR* tuvo un efecto antiviral significativo en la inhibición del título viral en células tratadas Fig. 18 a. El tratamiento con M β CD, no presentó efecto antiviral significativo sobre los niveles de título viral en células tratadas en comparación con el control sin tratamiento Fig. 18 b.

a)



b)

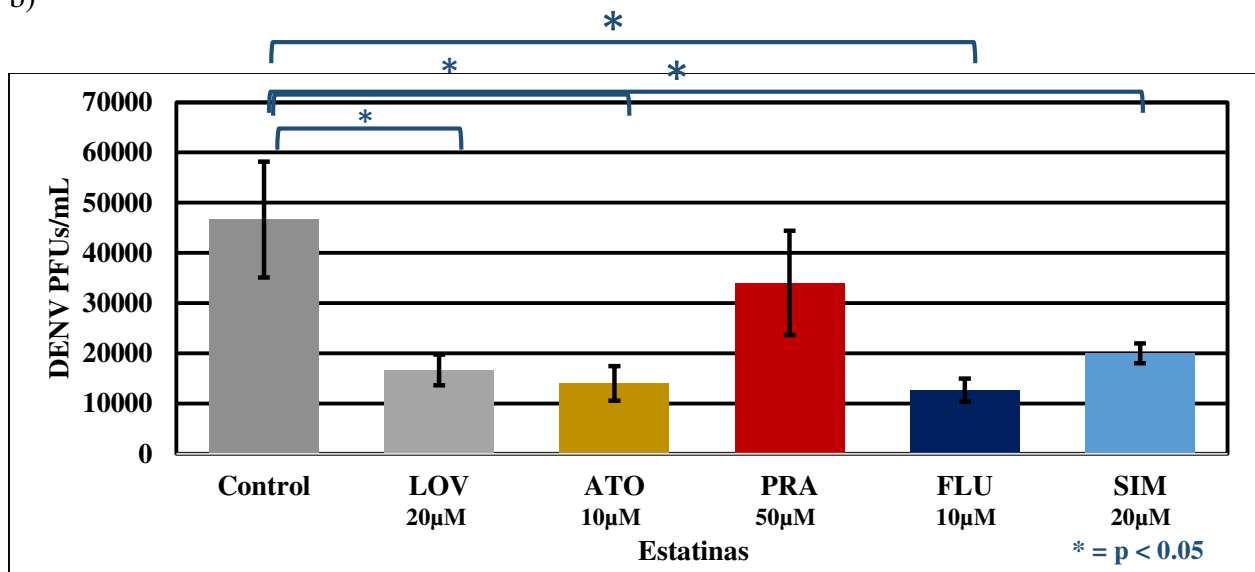
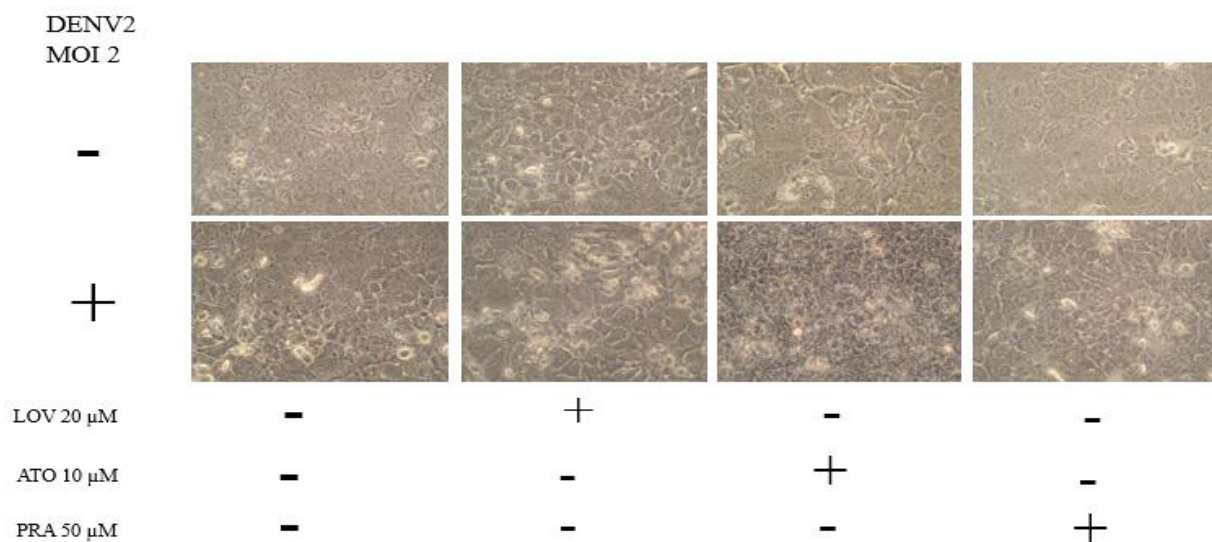


Figura 16: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición farmacológica de la síntesis de colesterol. Células Huh-7 fueron tratadas pre y post infección. Las células fueron tratadas con estatinas a las concentraciones indicadas, 24 h antes (a) y 12 h después (b) de la infección con DENV2 a una M.O.I. de 1. El sobrenadante celular de cada condición fue colectado para evaluar la concentración de partículas virales liberadas al medio mediante la técnica de UFPs. El título viral esta expresado en (plaque formation units, PFU/ mL) El control son células infectadas sin tratamiento.

a)



b)

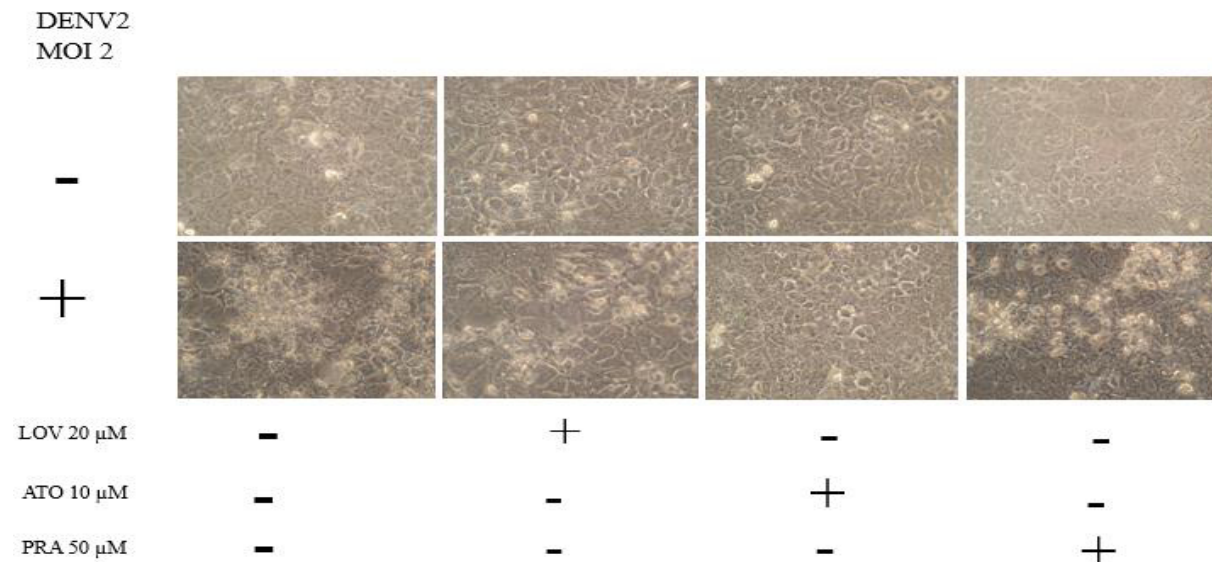
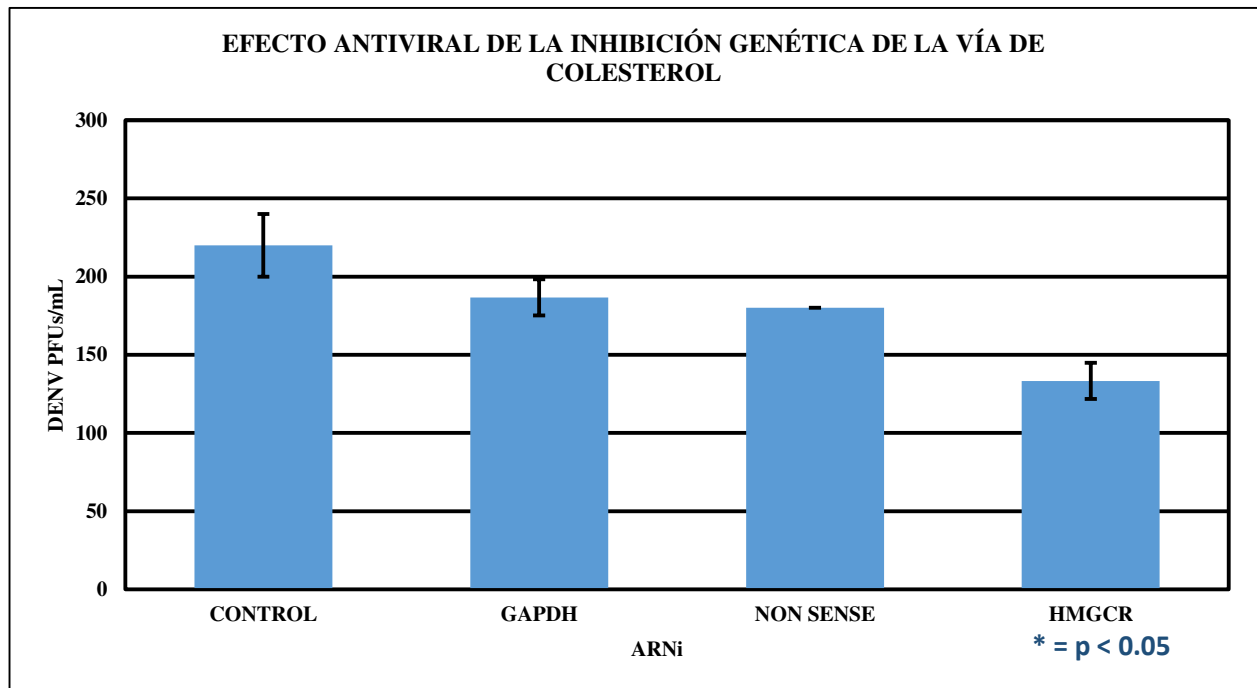


Figura 17: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición g de la síntesis de colesterol. Células Huh-7 fueron tratadas pre (a) y post infección (b). Las células fueron tratadas con 3 estatinas LOV, ATO y PRA a las concentraciones indicadas 24 h antes (a) y 12 h después (b) de la infección con DENV2 a una M.O.I. de 2. Transcurridas 48 h post infección, la monocapa celular fue observada al microscopio para la evaluación del efecto citopático. Objetivo de 10x.

a)



b)

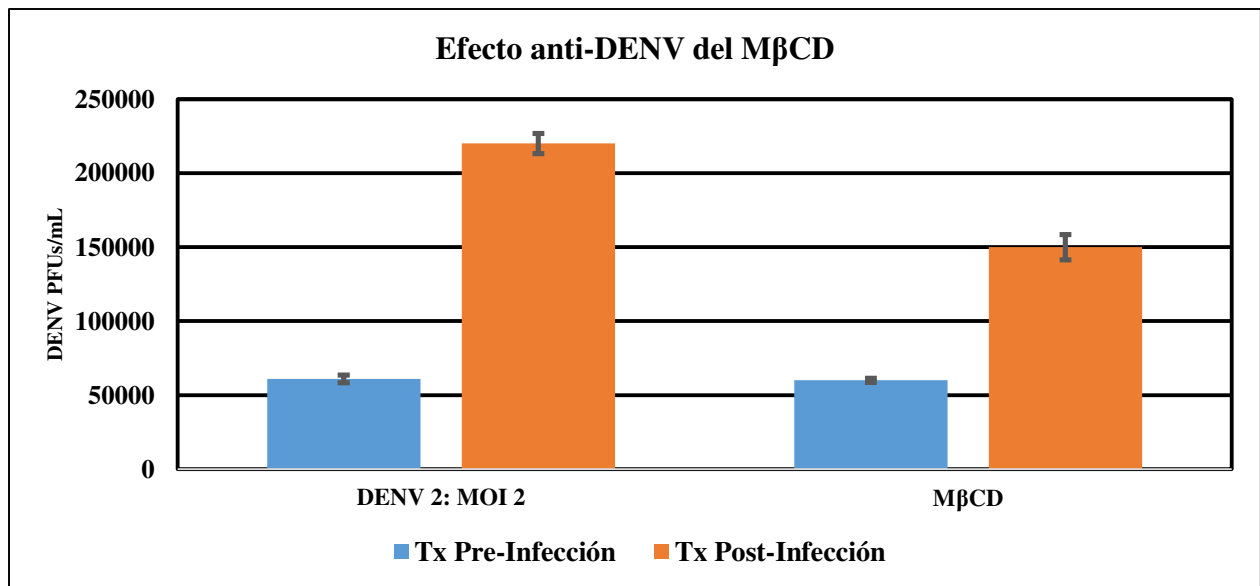


Figura 18: Evaluación del efecto antiviral de la inhibición genética y química de la síntesis de colesterol. Células Huh-7 fueron tratadas pre y post infección. Las células fueron tratadas con (a) ARNi-HMGCR 150 nM 12 h y (b) MβCD 24 h antes de la infección y con (b) MβCD 24 h después de la infección con DENV2 a una M.O.I. de 1. Tras 48 h se colectó el sobrenadante celular para titulación viral por UFPs.

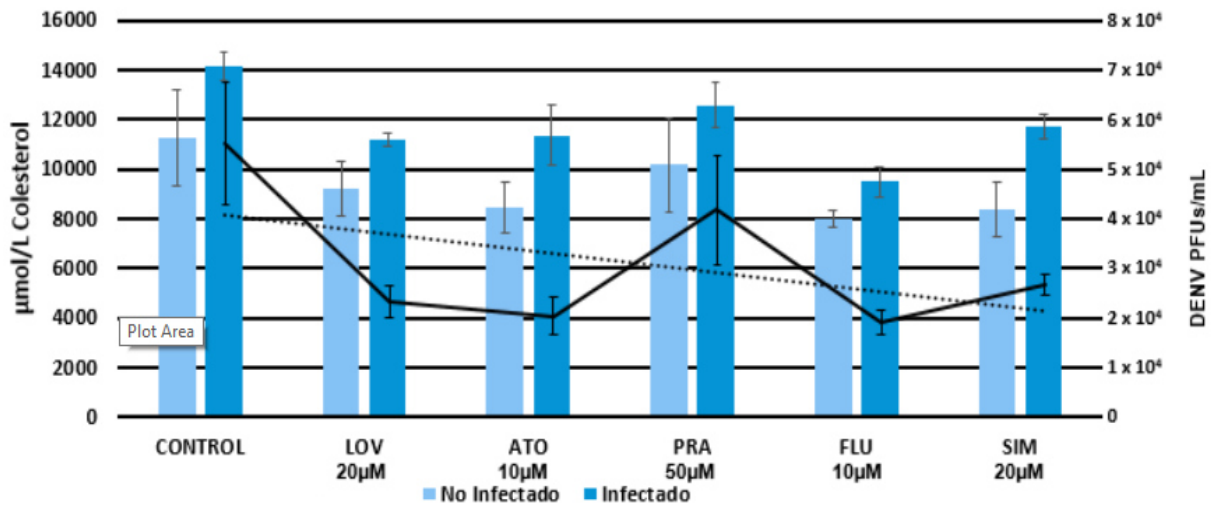
4. EL EFECTO ANTIVIRAL DE LOS AGENTES BLOQUEADORES DE COLESTEROL ESTÁ MEDIADO EN PARTE POR MECANISMOS ALTERNATIVOS A LA VÍA DE SÍNTESIS DE COLESTEROL

Aun cuando la inhibición del colesterol parece mediar en parte el efecto antiviral del bloqueo de la vía, otros factores podrían estar participando en este fenómeno. Para estudiar más de cerca esta posibilidad, células Huh-7 línea parental, fueron tratadas con estatinas y ARNi-*HMGCR* 12 h post-infección y 24 h pre-infección. Las células fueron infectadas con DENV 2 a una M.O.I. de 2. La infección se dejó transcurrir por 48 h tras las cuales se analizó el título viral y los niveles intracelulares de colesterol. Al sobre-lapar los gráficos de inhibición es posible observar que los porcentajes de inhibición de colesterol concuerdan ligeramente pero no en su totalidad con los niveles de inhibición de DENV mediante la evaluación del título viral. Estos resultados sugieren que existen el efecto antiviral observado sobre el DENV 2, no está dado en su totalidad por la inhibición de colesterol y que otras vías metabólicas podrían estar involucradas (Fig. 19).

5. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA Y GENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA ANTIVIRAL

Aun cuando nuestros hallazgos indican la participación del colesterol en la replicación del DENV 2, parece ser que otros mecanismos moleculares podrían mediar el efecto antiviral de las estatinas y el ARNi-*HMGCR*. Con el objetivo de dilucidar de manera más profunda y basados en estudios previos que reportan modificaciones en los patrones de expresión de genes de respuesta antiviral en presencia del DENV, el perfil antiviral de células Huh-7 fue analizado en diferentes condiciones de infección y tratamiento.

a)



b)

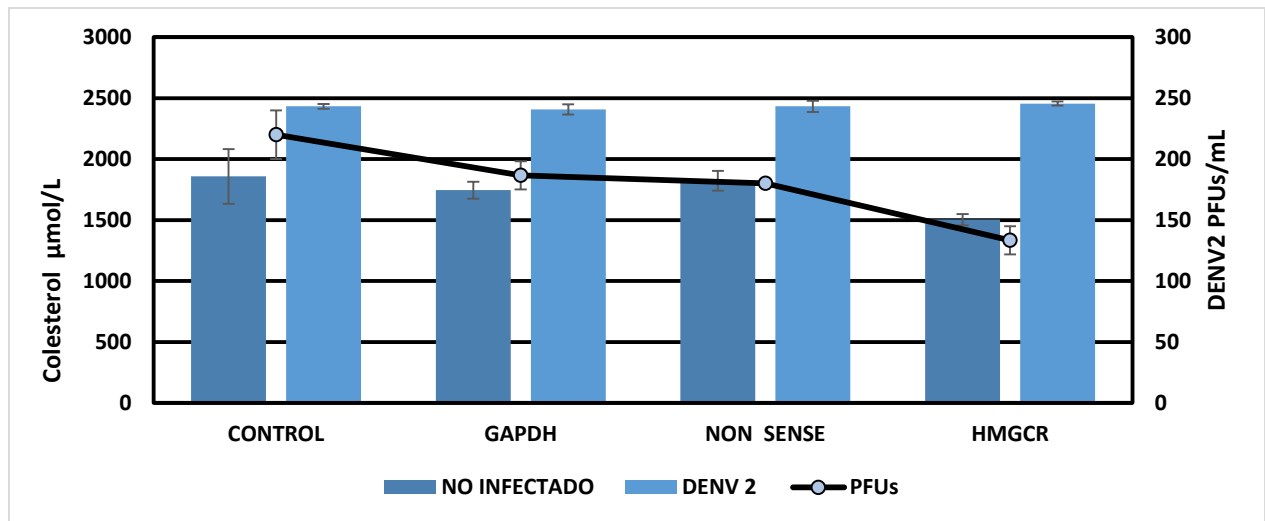


Figura 19: Inhibición simultanea de colesterol y DENV2. Células Huh-7 línea parental fueron tratadas con estatinas (a) y transfectadas con ARNi-HMGCR. Los diferentes tratamientos se dieron a las concentraciones indicadas para estatinas 12 h post-infección y 150 nM para los tratamientos de silenciamiento 24 h post infección. La infección se llevó a cabo utilizando DENV 2 a una M.O.I. de 2. Se evaluó el título viral (UFPs) y los niveles de colesterol intracelular 48 h post infección.

Las células fueron cultivadas e infectadas con DENV2 a una M.O.I. de 1. Tras 12 h post-infección, las células fueron tratadas con LOV (20μM) y PRA (50 μM) por 24 h. De igual manera,

células Huh-7 fueron transfectadas con ARNi-*HMGCR* (150 nM) y con ARNi-sin sentido a manera de control negativo por 24 h previo a la infección con DENV 2 a una M.O.I. de 1. De igual manera, se aplicó el tratamiento con M β CD (500 μ M) por 24 h previo a la infección con DENV 2 a una M.O.I. de 1.

En todas las condiciones se permitió el progreso de la infección por 48 h tras las cuales el ARN total fue extraído de las células para así evaluar la expresión de genes de respuesta antiviral con la plataforma PCR array de QIAGEN. De manera interesante se observó que la expresión de genes de respuesta antiviral, respuesta pro-inflamatoria y de activación por interferón fue modificada diferencialmente en las distintas condiciones (Fig. 20 a, b y c). Un cambio de tres veces más o tres veces menos en la expresión fue considerada significativa. La infección con DENV 2, demostró ser capaz de aumentar la expresión de múltiples genes de respuesta antiviral en la línea celular Huh-7. En la tabla 3 se muestra la lista de genes regulados positiva (rojo) y negativamente (azul) en los diferentes tratamientos comparados con células no infectadas. Los genes pro-inflamatorios *CCL3* y *CCL5*, se encontraron sobre-expresados en células infectadas al comparar con células sin infección. De igual manera el gen *ISG15*, un gen estimulado por interferón, aumentó su expresión más de 3 veces en presencia del DENV2. Este gen ha sido implicado en la defensa celular anti-DENV específica. Los genes *NF κ -B1*, *STAT1*, *TNF*, *TRADD* y *TRAF3*, genes ampliamente conocidos por su participación en la respuesta inflamatoria, aumentaron de igual manera su expresión en células infectadas. De igual manera se evaluó el efecto de LOV y PRA en células sin infección para evaluar su efecto sobre la expresión de estos genes. Al contrario de las células infectadas, en células tratadas con LOV, los genes *CCL3* y *CCL5* se encontraron sub expresados (más de 3 veces) en comparación con el control sin tratamiento mientras que *OAS2*, gen que codifica una proteína directamente relacionada con la respuesta inmune contra infecciones virales

aumentó su expresión más de 3 veces. El tratamiento con PRA y M β CD, no tuvo efecto significativo en la expresión de los genes de respuesta antiviral evaluados (Fig. 20 d y e).

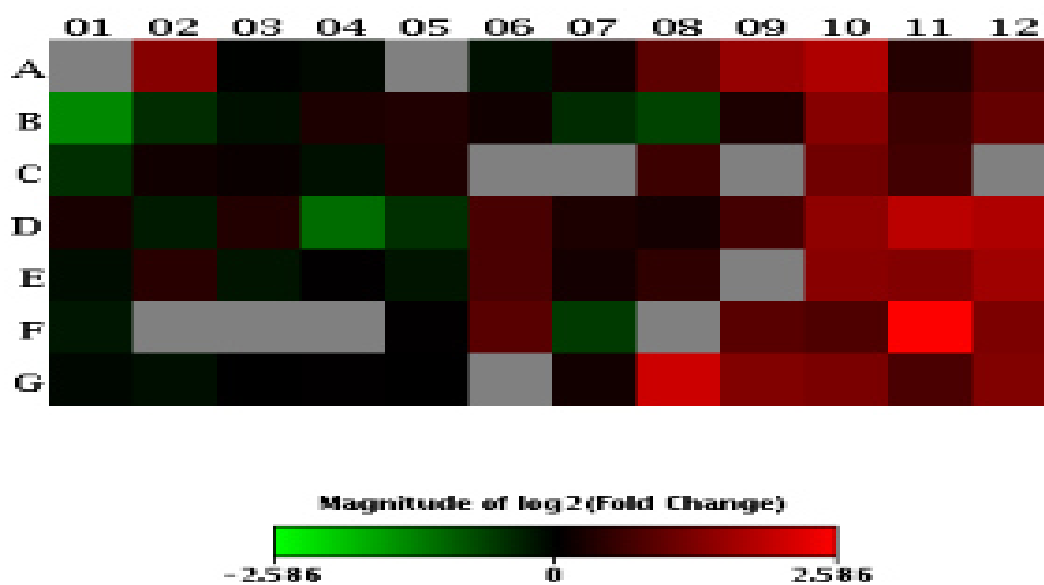
Para dilucidar si el efecto antiviral de la inhibición de colesterol pudiera estar dado, al menos en parte por la modulación de la expresión de genes antivirales, se utilizó la plataforma PCR array de QIAGEN para analizar la expresión de células Huh-7 infectadas, tratadas con LOV, PRA, ARNi-*HMGCR*, ARNi-sin sentido y M β CD. De manera interesante, en células infectadas tratadas con LOV, la mayoría de los genes de respuesta antiviral se mostraron regulados negativamente. Entre los pocos genes sobre-expresados en esta condición experimental, se encontró la *IL-15*, involucrada en proliferación celular y activación de células “natural killers”. Por otra parte, los genes *CCL5* y el gen inducido por interferón *CXCL11*, los cuales participan en respuesta pro-inflamatoria y quimotaxis de células T, se encontraron sub-regulados. Al evaluar la expresión de genes antivirales en células transfectadas con el ARNi-*HMGCR* y ARNi-sin sentido, encontramos que la inhibición genética de la vía de colesterol resulta en la regulación negativa de la mayoría de genes de respuesta antiviral y pro-inflamatoria (Fig 21 b). Entre los genes modificados se encontraron: *TLR9*, gen conocido por su función como detector del ARN de doble cadena, el cual aumento su expresión más de 4 veces con respecto al control. *SPP1*, *TNF- α* y *CCL5*, disminuyeron su expresión de manera similar a las células tratadas con LOV (Fig. 21 c). El tratamiento con el ARNi-sin sentido no mostró efecto significativo sobre los niveles de expresión de los genes estudiados en comparación con el control sin tratamiento. De igual manera el tratamiento con el agente secuestrador de colesterol M β CD, resultó en un perfil de expresión similar a las células infectadas sin tratamiento (Fig. 21 e).

6. LA MODULACIÓN DE LA VÍA DEL COLESTEROL INFLUYE EN LAS TRES VÍAS PRINCIPALES DE MONITOREO Y ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL CELULAR

En base a los resultados obtenidos en los experimentos previos, existe una evidente participación de la vía e síntesis de colesterol en la expresión de genes de respuesta antiviral celular. Estos genes participan en vías de señalización las cuales actúan en serie y cascada en respuesta a infecciones y estímulos tóxicos externos. Para un entendimiento más completo de la modulación de estos mecanismos en nuestro sistema experimental, se llevó a cabo un análisis *in silico* de genes alterados y en base al registro de función en la base de datos Kanehisa Laboratories Bioinformatics Center. El análisis demostró que dos vías principales en la respuesta antiviral se encuentran activadas a causa de la infección por DENV 2; las vías de los receptores *RIG-I*-Like y *TOLL*-like (Fig.22). La infección por dengue en células Huh-7, resultó en un aumento en la expresión de los genes *RANTES (CCL5)*, *NFkB* y *TNF*, los cuales forman parte de la rama terminal de la vía *TOLL*-like receptor (Fig.22a). Al tratar las estas células con el ARN-*HMGCR* se observó un efecto contrario en estos genes, contrarrestando el efecto activador del DENV 2 y aún más modulando negativamente la expresión de los genes *RANTES (CCL5)*, *TNF* y *NFkB* (Fig.22a). De manera interesante, la inhibición genética de la síntesis de colesterol, provocó la activación del gen *TLR9* más de 3 veces de su expresión basal. Este gen se encuentra en la rama proximal de la vía *TOLL*-like y se ha reportado que responde al estímulo de ARN de doble cadena. El tratamiento con LOV tuvo un efecto similar en la expresión de los genes de la vía del receptor *TOLL*-like en donde los genes *TRAF3*, *IRAK1* y *STAT1* de la rama proximal de la vía y *NFkB*, *RANTES (CCL5)*, *TNF* e *IL-8* de la rama distal de la vía se encontraron todos sub-expresados. Los tratamientos con PRAV y M β CD no tuvieron efecto en los genes de la vía

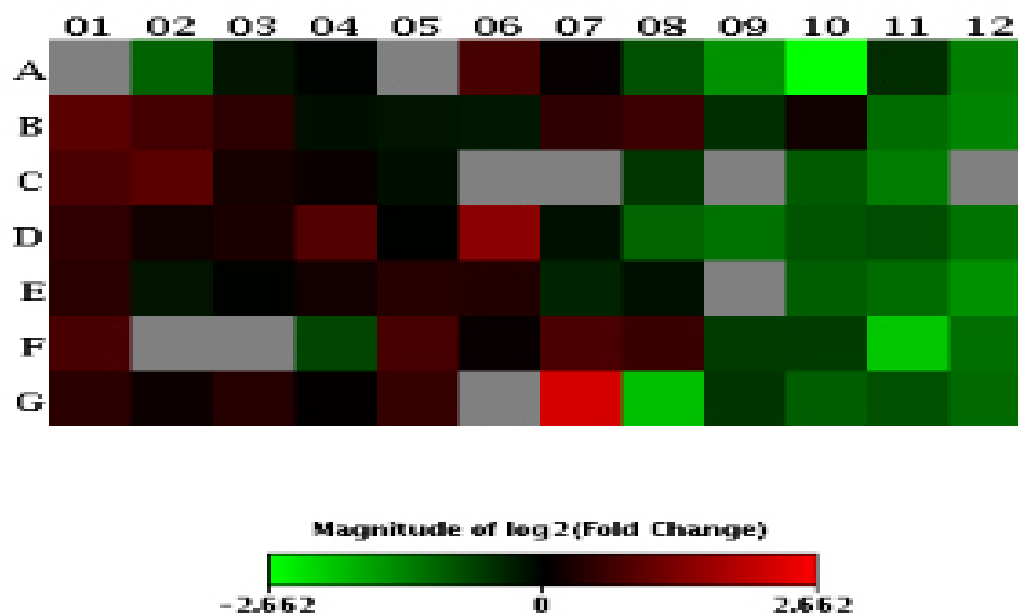
a)

DENV 2 +



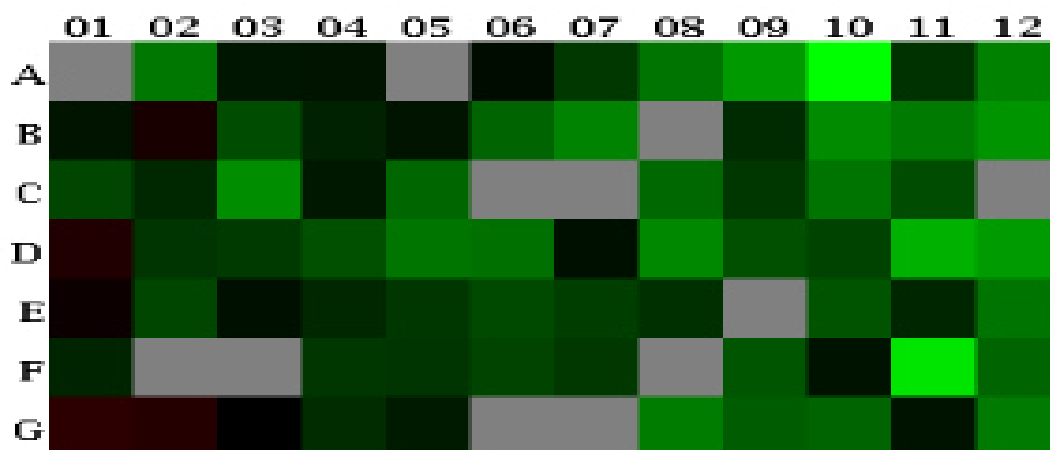
b)

DENV2 + / Anti-HMGCR +



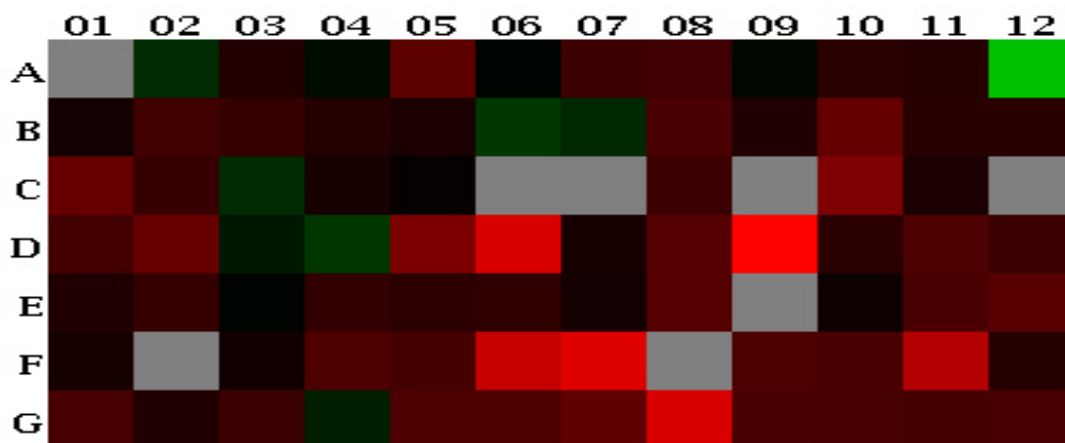
c)

DENV2 + / LOV +



d)

DENV2 + / PRAV +



e)

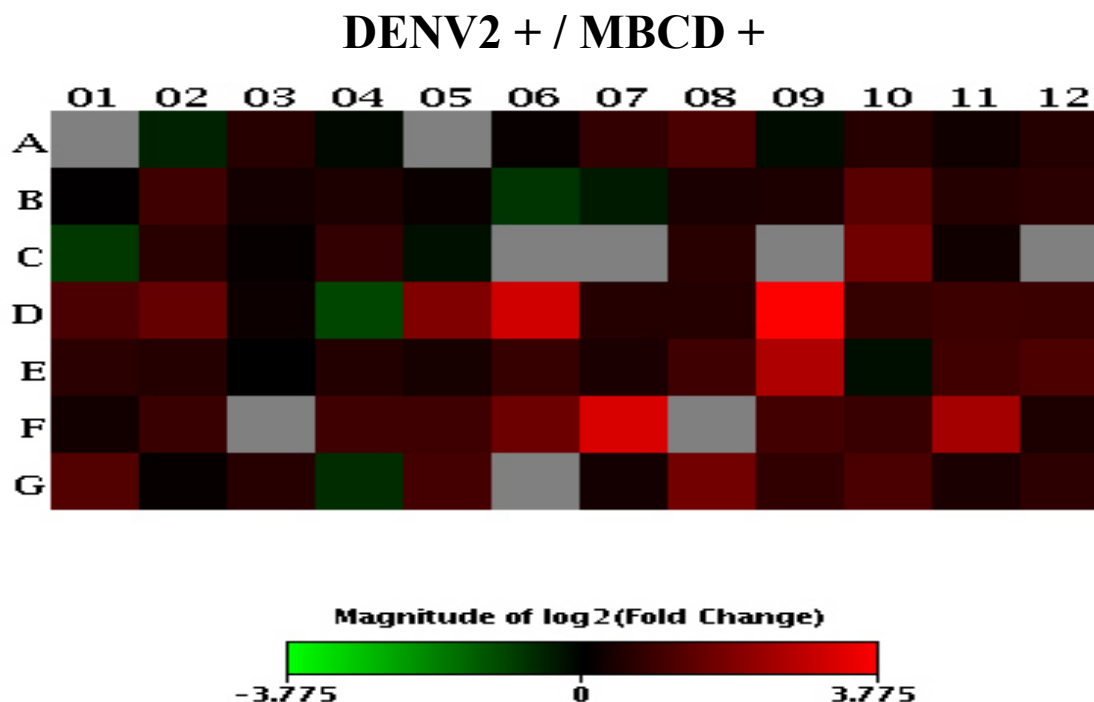
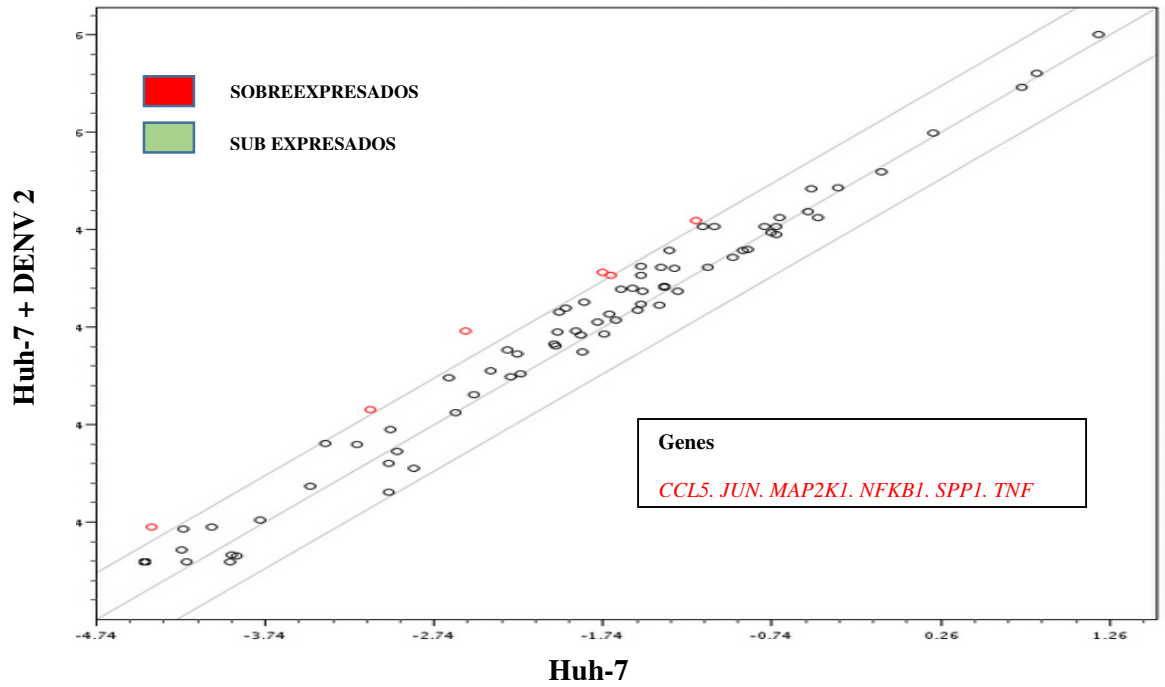


Figura 20: Perfil de expresión de genes de respuesta antiviral. Células Huh-7 fueron plaqueadas y tratadas pre-infección para el tratamiento con ARNi-HMGCR (150nM) y MβCD (500 μM) y post-infección para el tratamiento con estatinas (LOV [20 μM] y PRA [50 μM]). En ambos casos la infección se permitió por 48 h tras las cuales se evaluó la expresión de genes de respuesta antiviral mediante la plataforma de PCR array de QIAGEN por PCR en tiempo real. a) y b) Mapas de calor representando la expresión de cada uno de los genes de respuesta antiviral analizados en las 5 condiciones experimentales. Rojo = sobre-expresado y verde-sub-expresado

De igual manera se evaluó la vía del receptor *RIG-I*-Like en la cual los genes estimulados a causa de la infección con dengue en nuestro sistema fueron nuevamente los genes *NFκB* y *TNF* los cuales se encuentran en la rama distal de esta vía. Nuevamente los tratamientos inhibidores de la vía del colesterol, tanto genética como farmacológicamente, tuvieron un efecto inhibitorio en la expresión de múltiples genes a lo largo de la vía a saber; *SPPI*, *TRADD*, *DAK*, *TRIM25*, *TRAF3*, *NFκB* y *TNF* (Fig.22b). Los tratamientos con PRAV y con MβCD no tuvieron un efecto diferencial en la expresión de los genes e la vía al compararlos con las células infectadas sin tratamiento.

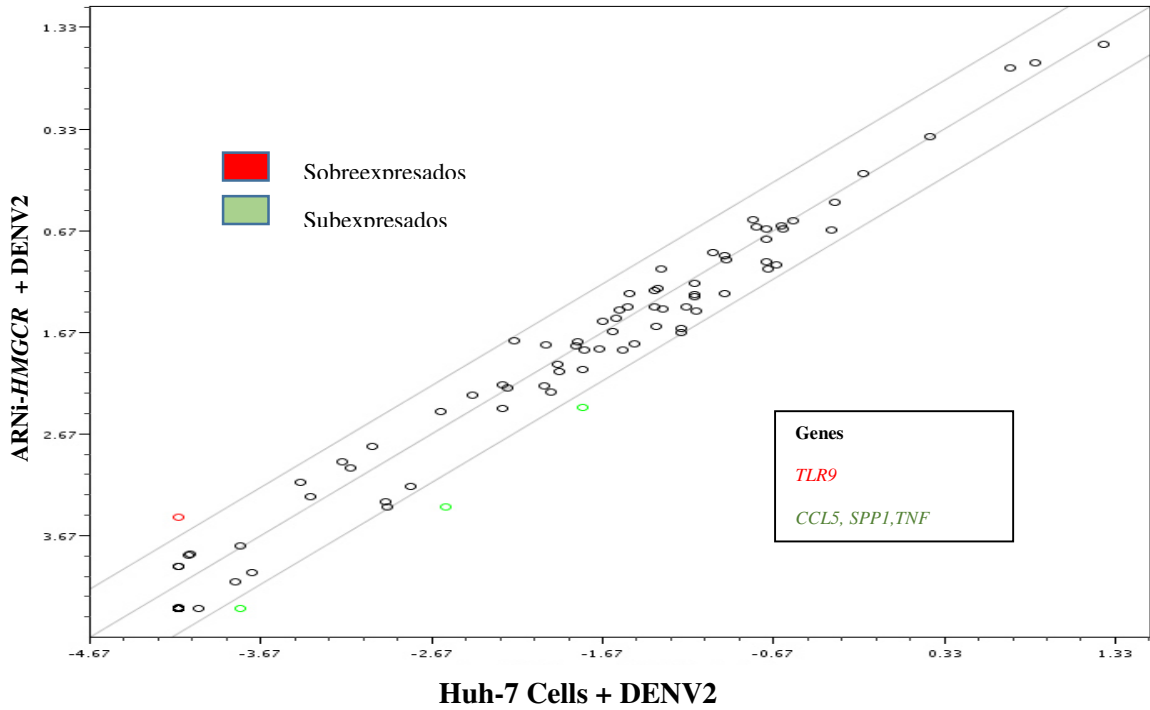
a)

Efecto de DENV 2 en el Perfil Antiviral de células Huh-7



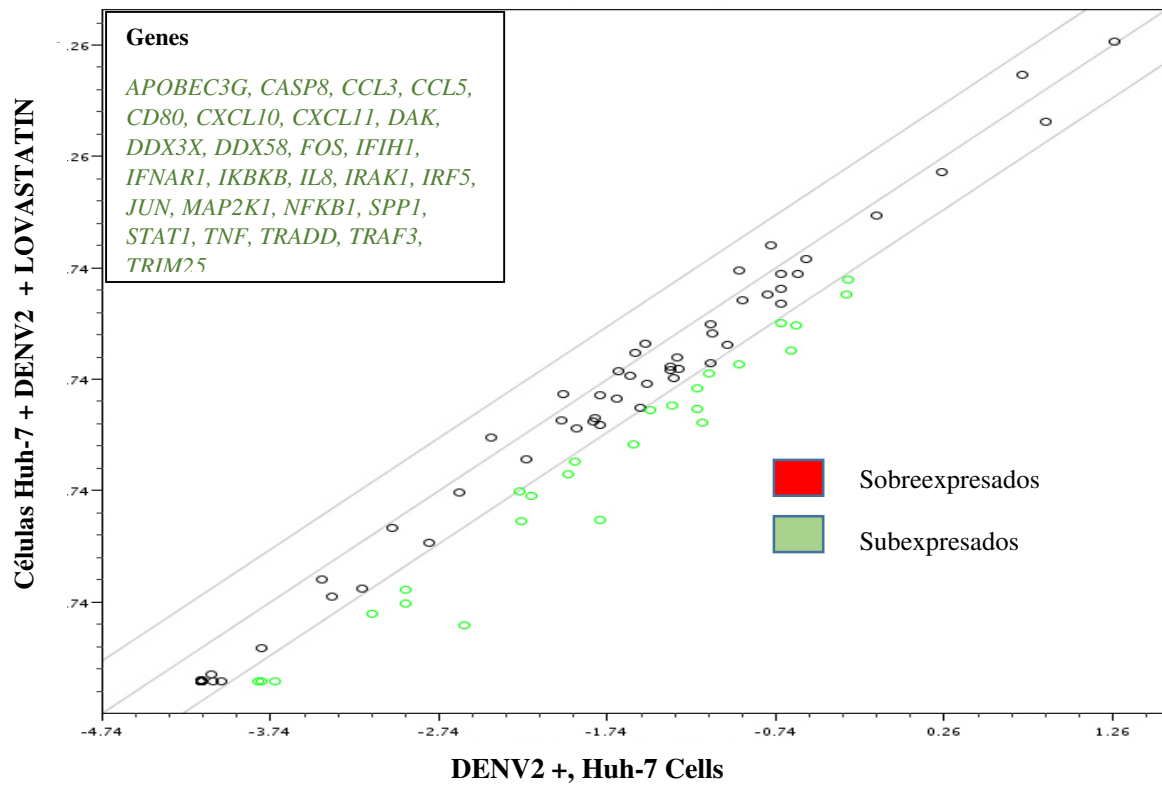
b)

Efecto de HMGR RNAi en Células Huh-7 Infeccionadas con DENV2



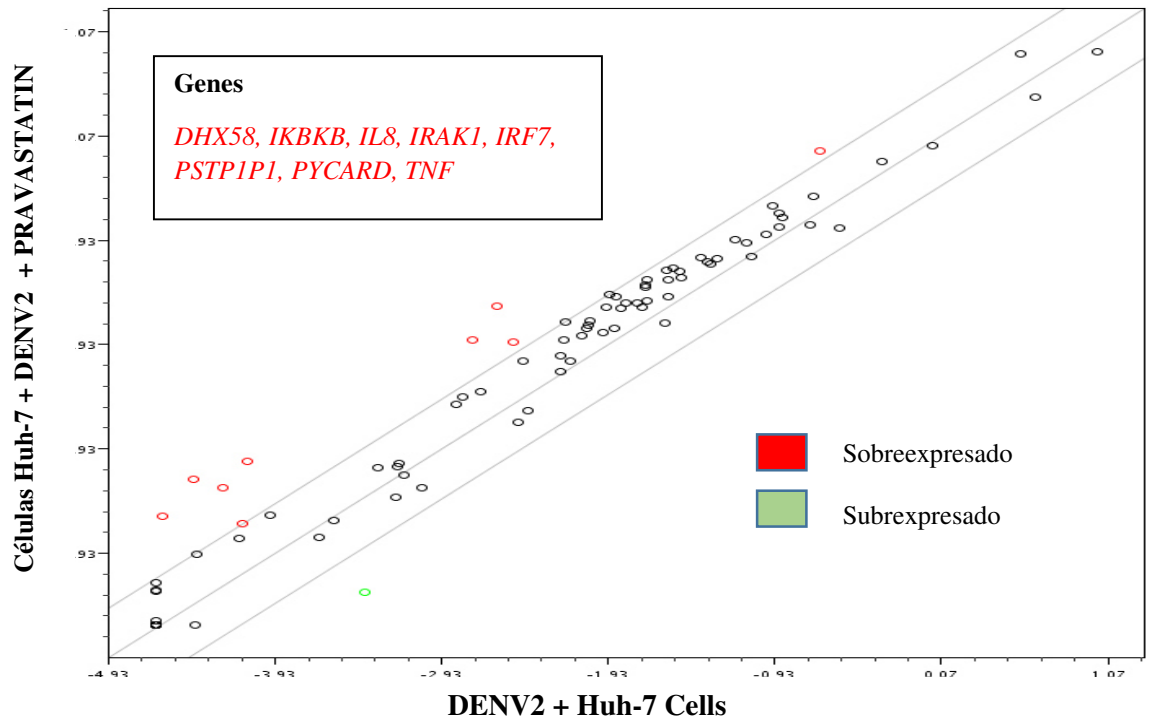
c)

Efecto de LOV en Células Huh-7 Infectadas con DENV2



d)

Efecto de PRAV en Células Huh-7 Infectadas con DENV2



e)

Efecto de M- β -CD en Células Huh-7 Infeccionadas con DENV2

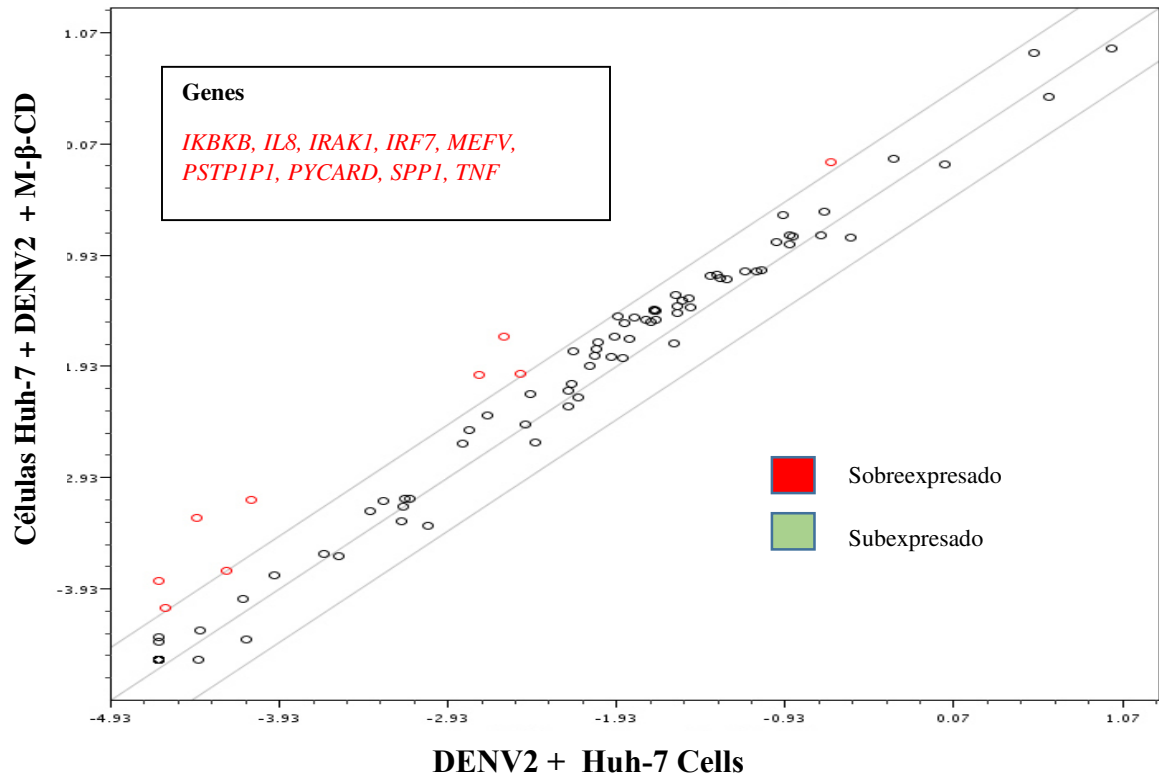
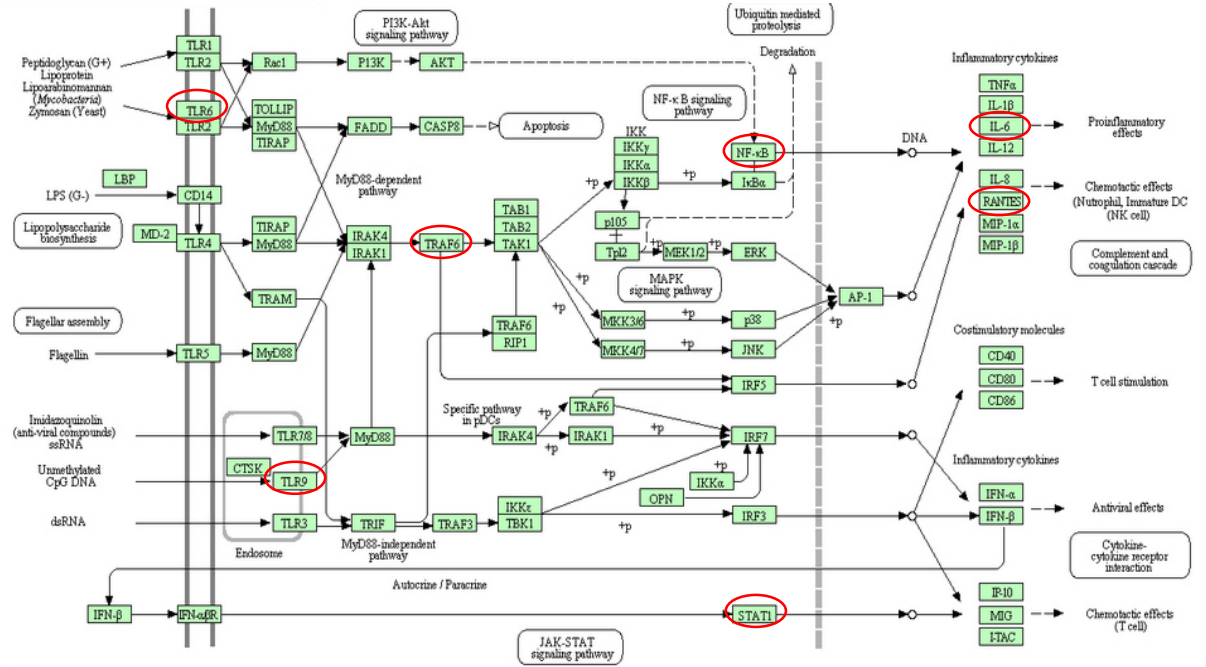


Figura 21: Perfil de expresión antiviral. Células Huh-7 fueron plaqueadas y tratadas pre-infección para el tratamiento con ARNi-HMGCR (150nM) y M β CD (500 μ M) y post-infección para el tratamiento con estatinas (LOV [20 μ M] y PRA [50 μ M]). En ambos casos la infección se permitió por 48 h tras las cuales se evaluó la expresión de genes de respuesta antiviral mediante la plataforma de PCR array de QIAGEN por PCR en tiempo real. a, b, c, d y e son gráficos de dispersión de cada una de las cinco condiciones experimentales mostrando cada uno de los genes cuya expresión fue modificada por el tratamiento. Se consideró significativo u aumento o disminución > 3 veces.

Tabla 3. Expresión de genes de respuesta antiviral

SIMBOLO	VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN COMPARADA CON EL GRUPO CONTROL									
	DENV2+	ARNI-HMGCR+	ARNI-HMGCR/DENV 2+	NONSENSE +	NONSENSE /DENV2+	LOV+ LOV/DENV 2+	PRAV+ PRAV/DENV2	MβCD+ MβCD/DENV2		
AIM2	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	2.642
APOBEC3G	2.5613	1.7313	1.0773	1.693	0.9188	0.2498	0.594	1.4317	0.6856	1.5468
ATG5	0.9809	0.4353	0.7284	0.4687	0.4123	0.3039	0.756	1.7847	1.5735	1.4429
AZI2	0.9406	0.7158	0.7802	0.4066	0.5689	0.3948	0.742	1.1364	0.9588	0.8679
CARD9	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	2.9576	2.8784
CASP1	0.8844	0.1527	1.2662	0.4135	0.6978	0.4527	0.766	2.0135	1.0359	0.7048
CASP10	1.1079	0.3011	0.9967	0.5337	0.5427	0.4204	0.563	2.2145	2.1182	1.5764
CASP8	1.8761	0.1323	0.895	0.5807	0.6517	0.3278	0.454	2.3439	2.138	1.6178
CCL3	2.8227	0.2711	0.8443	0.8274	0.7821	0.1623	0.435	0.6261	0.9965	0.5505
CCL5	3.3937	0.0634	0.4596	0.3037	0.538	0.1722	0.15	0.3058	1.731	0.1935
CD40	1.2768	0.1849	0.8001	0.5342	0.5051	0.7199	0.701	1.0095	1.6674	1.0215
CD80	1.7889	0.2508	0.6185	0.3645	0.3106	0.2457	0.366	1.1943	0.133	1.2517
CD86	0.3736	0.1295	0.6164	0.49	0.3357	0.4906	0.293	1.0402	1.3671	0.6609
CHUK	0.7262	0.5665	1.0069	0.5667	0.4946	0.4372	0.975	2.5986	2.2012	1.9819
CTSB	0.8825	0.2316	1.0395	0.5644	0.5017	0.2452	0.35	1.1955	1.9126	1.3649
CTSL	1.2023	0.4124	0.9362	0.4631	0.5065	0.345	0.799	1.4916	1.6268	0.9899
CTSS	1.2425	0.2062	0.9282	0.458	0.6396	0.3834	0.98	1.1622	1.4365	1.1279
CXCL10	1.1024	0.2481	0.7913	0.4174	0.5126	0.1325	0.323	0.3579	0.5934	0.34
CXCL11	0.7384	0.1303	0.8778	0.2457	0.3125	0.2302	0.146	0.8994	0.7097	0.8256
CXCL9	0.6239	0.8631	0.8215	0.872	0.3202	0.1639	0.317	1.7187	2.4649	0.8259
CYLD	1.2114	0.6378	0.7491	0.4078	0.5446	0.4317	0.732	1.3382	1.5481	1.0122
DAK	2.565	0.2556	2.4837	1.9882	2.3767	0.8907	0.468	2.9114	3.2527	2.9087
DDX3X	1.5118	0.3986	0.5942	0.3943	0.387	0.4679	0.341	1.7934	1.691	1.2368
DDX58	1.9913	0.2375	0.648	0.3867	0.3327	0.2366	0.323	2.0141	1.7002	1.3066
DXH58	0.7105	1.4246	1.0345	1.5064	0.7069	1.0775	0.306	1.1148	3.3357	1.8794
FADD	1.1057	0.4879	1.8101	1.3239	1.0798	0.8337	0.68	1.29	1.9745	1.5104
FOS	1.0675	0.8158	1.07	0.7968	1.0156	0.251	0.188	2.5103	0.6921	0.9353
HSP90AA1	0.8893	0.5815	0.8236	0.4894	0.6435	0.4423	0.666	2.288	1.4008	1.4262
IFIH1	1.2236	0.5615	0.9441	0.4487	0.7797	0.3062	0.356	0.9117	1.1583	0.6579
IFNA1	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	2.642
IFNA2	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	2.642
IFNAR1	1.499	0.5371	0.8745	0.5565	0.4713	0.4373	0.422	2.039	2.0679	1.7004
IFNB1	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.051	2.4453	1.171	2.642
IKBK	2.1637	0.4861	0.9631	0.6703	0.7462	0.5739	0.522	5.4201	4.2763	3.6777
IL12A	1.5781	0.4995	0.5514	0.4414	0.6002	0.4115	0.621	1.6781	1.4486	1.637
IL12B	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	2.642
IL15	1.1662	1.5493	1.4158	0.825	1.254	0.6042	1.737	3.5751	2.2549	2.1409
IL18	0.8291	0.9803	0.8003	0.5682	0.6374	0.2846	0.44	4.1056	3.2733	3.5737
IL1B	1.2524	0.8193	1.3182	0.7273	0.5948	0.4368	0.618	1.7512	0.8386	1.2233
IL6	0.4595	0.8228	0.709	0.2549	0.3762	0.308	0.173	0.6148	0.6101	0.553
IL8	0.7031	0.79	0.5944	0.3967	0.507	0.0996	0.165	3.7228	4.1949	3.0114
IRAK1	1.637	0.2851	3.8568	3.2582	3.185	1.5189	0.419	8.6131	11.7183	12.0831
IRF3	1.2008	1.0039	0.9227	0.5382	0.8933	0.4952	0.992	1.314	1.3932	1.1616
IRF5	1.1338	0.2845	0.4686	1.2871	1.82	0.2448	0.211	5.5427	2.7458	2.8528
IRF7	1.5949	0.8223	0.5952	0.9169	2.6428	1.1971	0.608	15.3299	17.4071	23.443
ISG15	2.7242	0.9663	1.2665	0.845	1.2877	0.658	1.23	0.9293	1.7356	0.9998
JUN	3.6892	0.7642	1.8257	1.5668	1.5747	1.0936	0.42	1.6203	2.5104	1.5028
MAP2K1	3.4279	0.901	1.2948	1.0157	1.2288	0.6637	0.51	1.9857	2.0696	1.2409
MAP3K7	0.8607	0.7808	0.7223	0.4852	0.5133	0.4798	0.707	1.343	1.0438	1.0539
MAPK14	0.8533	0.4284	0.9497	0.6424	0.5968	0.4884	0.445	2.0219	1.7524	1.492
MAPK3	1.6623	0.5806	1.8041	1.319	1.6583	0.9835	0.681	2.0239	1.84	1.661
MAPK8	1.1384	0.7364	0.7494	0.6042	0.549	0.4672	0.539	1.8285	1.3636	1.2377
MAVS	1.3677	0.6032	1.0437	0.8818	0.8017	0.9179	0.764	2.1525	2.7011	2.0657
MEFV	1.9958	1.3709	0.9923	0.9298	1.0241	0.8401	1.014	3.6305	1.171	2.642
MX1	2.6057	0.9697	1.1362	0.9637	1.2042	0.7125	0.936	1.0299	1.2662	0.7555
MYD88	2.4968	1.1595	0.976	0.5135	0.8473	0.8791	1.571	2.0901	2.4488	1.7828
NFKB1	3.0233	0.6306	0.9031	0.7303	0.7007	0.7213	0.744	2.835	2.834	2.0316
NFKBIA	0.8512	0.8912	1.2322	1.0981	1.1642	0.4024	0.548	1.1316	1.3963	0.9506
NLRP3	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	2.642
NOD2	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.9198	1.2989	2.642
OAS2	1.9958	1.3709	1.0239	0.6076	1.1854	1.3629	1.034	2.7135	2.5585	2.642
PIN1	1.0051	0.3126	1.4282	1.3029	1.6354	1.1807	0.542	1.912	2.3107	1.9175
PSTPIP1	1.8289	2.6567	1.668	2.2383	2.6042	0.8453	0.794	6.9592	9.6742	9.6726
PYCARD	0.6543	1.2178	0.9612	0.8506	1.9501	0.4397	0.331	6.0733	12.3945	7.2821
PYDC1	1.9958	3.3728	2.5727	1.7644	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	1.171	3.7566
RELA	1.8228	0.6956	1.0069	1.0164	1.1399	0.9239	0.636	2.5166	2.5322	1.6711
RIPK1	1.7059	0.5577	0.9497	0.714	0.7632	1.5648	1.368	2.1766	2.4309	1.774
SPP1	5.9356	1.092	1.1982	0.6896	1.4746	0.2216	0.361	5.1148	7.9645	4.7837
STAT1	2.3788	0.6559	0.9257	0.6965	0.8008	0.705	0.701	1.6788	1.6006	1.1275
SUGT1	0.9471	1.5032	1.1021	0.7115	1.0459	0.7721	1.621	2.9855	2.3497	1.8976
TBK1	0.9004	1.1654	0.8453	0.5387	0.9019	0.6976	1.426	1.5208	1.5357	1.1466
TICAM1	0.9922	1.2561	1.0981	0.8342	0.9575	0.9512	1.011	1.4041	2.0731	1.3085
TLR3	1.0005	1.0451	0.8645	0.4588	0.6295	0.4321	0.583	0.6738	0.7831	0.6547
TLR7	0.9823	1.3394	1.2332	1.0465	0.5116	0.4062	0.715	1.335	2.5393	1.602
TLR8	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	2.4453	2.4933	2.642
TLR9	1.1278	0.7747	4.5333	0.631	1.2611	0.5497	0.573	3.51	3.1245	6.9488
TNF	4.2063	1.2478	0.9032	1.8876	1.0397	0.3681	0.923	2.2257	11.6629	2.8674
TRADD	2.4592	0.3327	1.4532	1.8689	1.8965	1.3967	0.799	1.2424	2.4099	1.4782
TRAF3	2.3195	0.6686	1.0022	0.8905	0.9535	1.0089	0.681	2.8542	2.3542	1.7736
TRAF6	1.655	0.7183	0.793	0.7725	0.6989	1.0315	1.33	1.5778	2.2308	1.414
TRIM25	2.4606	0.4485	0.9769	1.0703	0.9985	0.8009	0.558	1.5513	2.3914	1.5879
ACTB	0.9532	1.1732	1.345	1.2901	1.0858	1.9318	1.808	2.2697	2.2181	5.0506
B2M	1.091	0.8519	0.949	0.7909	0.9293	0.7437	0.818	0.9164	0.9918	0.7445
GAPDH	1.0864	0.7777	1.2222	1.6452	1.5309	1.1107	0.559	0.5895	0.7012	0.5513
HPRT1	0.7605	0.9381	0.8167	0.7707	0.7273	0.9427	0.971	0.9751	0.8073	0.6592
RPLP0	1.1639	1.3715	0.7849	0.7729	0.8901	0.6647	1.246	0.8364	0.803	0.7318
HGDC	1.9958	1.3709	0.9923	0.5606	1.0241	0.3695	1.014	10.7751	1.171	2.642
RTC	1.9627	1.3095	1.1081	0.902	0.7924	0.6264	0.958	7.9632	3.1754	2.7427
RTC	1.8022	1.2178	1.0271	0.8853	0.734	0.5825	0.791	7.2662	3.0616	2.5356
RTC	2.256	1.3314	1.0536	0.9201	0.7816	0.58	0.829	7.2993	3.3633	2.3508
PPC	1.7487	1.0641	1.0177	0.599	1.1422	0.3785	1.122	1.6701	1.441	0.9581
PPC	1.8943	1.2389	1.0797	0.6527	1.2425	0.4049	1.31	3.4019	1.5905	1.0114
PPC	1.9989	1.5901	1.1553	0.6492	1.2998	0.3394	1.399	3.2634	1.647	1.0705

a)



b)

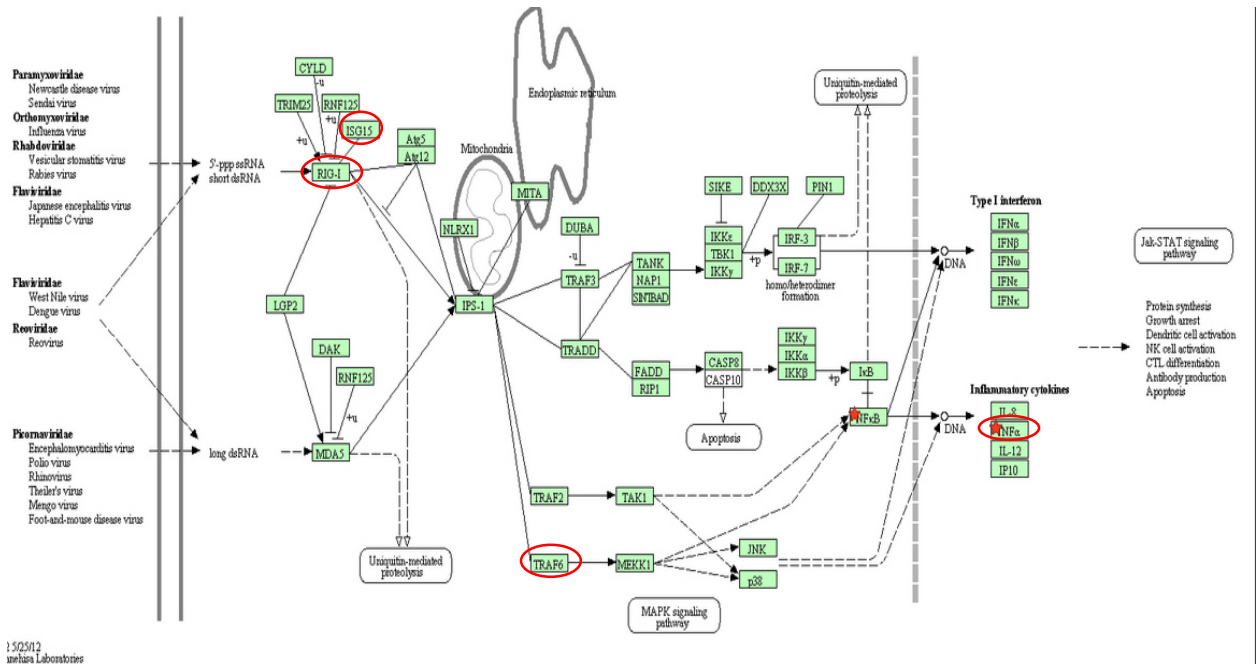


Figura 22. Representación esquemática de vías de señalización. a) Esquema de cascada de señalización de receptores TOLL-like en donde se muestran los genes de activación temprana media y tardía a lo largo de la vía. b) Representación de cascada de señalización de receptores RIG-I-like en donde se muestran los genes sensores y efectores a lo largo de la vía.

DISCUSION

En estudios previos en donde se evalúa el rol del colesterol y lípidos en el marco de infecciones virales incluyendo DENV, las estatinas como LOV, PRA y FLU, así como varios agentes secuestradores de colesterol, como ácido zaragócico y M β CD han sido utilizados en experimentos de inhibición de la vía e incluso el transporte de colesterol [45]. Un análisis detallado de los resultados y reportes científicos relacionados, nos ha llevado a concluir que el efecto de la modulación de la vía del colesterol al momento de la infección por DENV está significativamente influenciado por la naturaleza de la molécula inhibitoria utilizada, el periodo de tratamiento, la línea celular y el serotipo o cepa viral en cuestión. Sin embargo, a pesar de estas variaciones, es posible asumir algunas conclusiones interesantes al respecto. En el presente trabajo se analizó el efecto del tratamiento con cinco diferentes estatinas sobre los niveles y capacidad infectiva del DENV2, con el fin de evaluar cada uno de sus perfiles antivirales específicos. Se encontró que cuatro estatinas evaluadas, LOV, ATO, FLU y SIM presentan efecto antiviral contra el DENV2. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los cuales se ha demostrado que las estatinas, particularmente LOV y ATO, poseen propiedades anti-DENV, tanto *in vitro* como en ensayos pre-clínicos [54] [55]. PRA fue la estatina con el menor efecto antiviral y es muy probable que su baja liposolubilidad le impida ejercer su efecto modulador al no poder atravesar de manera efectiva las membranas celulares. Ha sido reportado previamente que la extracción del colesterol de las membranas o la inhibición de su vía de síntesis, parece no afectar los estadios de entrada y fusión viral del DENV [46]. Esta hipótesis concuerda con nuestros resultados en los cuales el pre-tratamiento de las células con estatinas tuvo poco o nulo efecto sobre la infectividad del DENV. Aun cuando existen otros estudios en los cuales se reporta la inhibición de los estadios de entrada y fusión viral del DENV mediante el uso de agentes secuestradores de colesterol, este efecto

inhibitorio podría estar dado por un efecto virucidal y no antiviral ya que muchas veces no es claro si el agente utilizado estuvo en contacto directo con las partículas virales y/o los periodos de evaluación podrían ser muy cortos [44] [56]. La célula obtiene colesterol mediante dos vías principales, el transporte del mismo del exterior al interior de la célula y la síntesis *de novo* de colesterol, de los cuales el transporte de colesterol parece ser el más utilizado para la regulación de sus niveles intracelulares. En este participan diferentes receptores que involucran lipoproteínas normales y modificadas las cuales interactúan con el colesterol intracelular el cual se encuentra en grupos dinámicos tanto en membranas como en cuerpos lipídicos [57]. En un estudio previo de Poh y cols. se demostró que el bloqueo de una o ambas vías tiene reduce la entrada y replicación del virus, lo cual confirma que el DENV se vale de ambos mecanismos para su replicación [58]. Sin embargo, no es aun claro si el bloqueo de una determinada vía, a saber, el transporte de colesterol, tenga un mayor impacto sobre la entrada del virus a la célula y que el bloqueo de la síntesis *de novo* de este compuesto tenga su efecto en los procesos de replicación viral. En este trabajo se utilizaron agentes inhibidores de la síntesis *de novo* de colesterol y secuestradores del colesterol de la membrana, por lo cual esta interrogante no fue evaluada. En nuestros ensayos de tratamiento post-infección, las estatinas tuvieron un efecto antiviral significativo siendo la FLU la estatina más efectiva. Estos resultados concuerdan con los reportes que aseguran que el colesterol es necesario para que el DENV 2 lleve a cabo con éxito las etapas tardías de la infección (ensamblaje y gemación) [54]. Para estudiar más a fondo los mecanismos de infección del DENV y su relación con la vía del colesterol, se llevó a cabo la inhibición genética de la vía mediante el uso de un ARNi-*HMGCR*. Debido a las condiciones de transfección, el tratamiento de silenciamiento fue aplicado solo en el esquema de tratamiento pre-infección, en este ensayo observamos una leve reducción en los valores del título viral en las células tratadas, lo cual

confirma nuestra conclusión previa de que el colesterol no es indispensable para la entrada y fusión del DENV 2. De manera interesante, se ha reportado una vía alterna de entrada del DENV a la célula, en la cual DENV 1 utiliza endocitosis mediada por clatrina para su entrada y fusión en células Vero mientras que DENV 2 utiliza una vía independiente de clatrina, la cual no es afectada por el tratamiento con M β CD y Nistatina. Más aun, en el mismo estudio un mecanismo de entrada dependiente de clatrina por parte del DENV 2 en células A549 [21]. Estos hallazgos revelan que los mecanismos de entrada del DENV 2 a la célula, son más complejos y flexibles de lo esperado y aun dentro del mismo serotipo podríamos esperar variaciones en la dinámica de la infección viral. De igual manera, observamos un aumento significativo en los niveles de colesterol intracelular en células infectadas comparadas con el control sin infección a 24 y 48 h post-infección. Este fenómeno concuerda con reportes previos en los cuales se registró un aumento en la actividad de la enzima HMGCR y en el transporte de colesterol en células infectadas con DENV 2, lo cual demuestra que el virus interviene en las dos vías principales de producción de colesterol lo cual resulta en un importante aumento del colesterol intracelular [35] [44]. En nuestro estudio el DENV 2 incrementó los niveles de colesterol intracelular en todas las condiciones experimentales, sin embargo un análisis más profundo es necesario para explicar si este efecto es debido al aumento en la actividad de alguna enzima en la vía de síntesis o en el transporte de colesterol. En este trabajo, se evaluó de igual manera la modificación del perfil antiviral de células Huh-7 en las diferentes condiciones experimentales con el fin de dilucidar si esta regulación metabólica podría estar, al menos en parte, interviniendo o participando en el efecto antiviral de los inhibidores de colesterol. De acuerdo a lo esperado, el perfil antiviral de las células Huh-7 se encontró alterado en presencia del DENV 2. Al comparar células Huh-7 infectadas con DENV2 a una MOI de 1 con células no infectadas, encontramos varios genes alterados. Los genes *CCL3* y

CCL5 se encontraron sobre-expresados en células infectadas en comparación con las células control sin infección. En estudios previos, en donde se evaluó la infección por DENV en ratones, se detectaron niveles incrementados de estas quimosinas en el bazo e hígado de los roedores, siendo indicativos de dengue severo. En el mismo estudio, se encontró que los niveles reducidos en la expresión del gen *IL-6* fueron indicadores de la forma leve de la infección. En nuestro estudio, la infección por DENV 2, redujo la expresión del gen *IL-6* [51]. De igual manera *ISG15*, un gen estimulado por interferón, fue regulado positivamente en presencia del DENV2. Este gen ha sido implicado en la función celular anti-DENV específica vía ISGlación de proteínas [52]. Esto hace pensar que el colesterol es necesario, no sólo como componente estructural de las membranas sino también, como factor de señalización para la activación de diferentes vías metabólicas y/o elemento importante para la adición de compuestos para completar la maduración de proteínas [52]. En nuestros análisis de expresión se observó que en células tratadas con LOV, los genes *CCL3* y *CCL5* fueron sub-expresados, al contrario de lo observado en células infectadas compradas con el control. Al mismo tiempo, el tratamiento con LOV 20 μ M provocó que *OAS2*, gen involucrado en la respuesta inmune innata se elevara más de cuatro veces. Ningún otro tratamiento de inhibición provocó la sobreexpresión de este gen, lo cual podría sugerir una interacción directa con LOV. También el gen *TRADD*, el cual expresa una proteína inhibidora de apoptosis, aumentó su expresión como resultado del tratamiento con estatinas. Es importante mencionar que nuestras observaciones del efecto citopático celular en células infectadas indican una propiedad protectora y anti-apoptótica de las estatinas al observar una reducción en las características apoptóticas (fraccionamiento celular, cambios morfológicos, reducción en la adherencia, etc) de células tratadas. Es importante mencionar que siendo nuestra línea celular de trabajo Huh-7 una línea celular de origen carcinogénico, estas células poseen vías metabólicas

alteradas y un estado constitutivo de perfil inflamatorio. Esto podría hasta cierto punto, explicar la sobreexpresión de los genes relacionados a esta condición inflamatoria, y que la reversión de este estado de estrés celular como resultado del tratamiento con estatinas pudiera mediar el efecto antiviral al facultar las células para defenderse una vez reducido este estado pro-inflamatorio. Para evaluar si el efecto antiviral de los agentes inhibidores de colesterol está, al menos en parte, dado por la modulación de la vía de respuesta antiviral celular, la vía del colesterol fue genéticamente (ARNi-HMGCR), farmacológicamente (LOV y PRA) y químicamente (M β CD) bloqueada en células infectadas con DENV 2. El gen IL-15 se encontró sobre-expresado en células tratadas con LOV y se ha reportado que este gen no cambia su expresión en presencia de DENV 2. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que el tratamiento con LOV indujo la sobreexpresión de este gen [59]. Por otra parte, los genes *CCL5*, *SPPI* y *TNF- α* , se encontraron sub expresados en células tratadas con LOV y ARNi-*HMGCR*. La expresión de estos genes no fue alterada al tratar las células con PRA o M β CD, cuya aplicación no indujo ningún cambio en la expresión de los genes de interés al comprarlos con la expresión de los mismos en células infectadas sin tratamiento. Este efecto diferencial en la expresión génica, obtenido en los tratamientos con LOV y ARNi-*HMGCR* indica la relación entre la vía del colesterol y la expresión de genes de respuesta antiviral no antes reportada. Es necesario un estudio más profundo de esta interacción el cual incluya ensayos in vivo que permitan determinar la naturaleza de esta interacción y los genes y vías involucrados. Contrario a lo esperado, varios genes de respuesta antiviral celular se encontraron sub-expresados en las células tratadas con LOV y ARNi-*HMGCR*. Este fenómeno podría sugerir que la reducción de los niveles de colesterol resulta en una disminución de los niveles de DENV, lo cual a su vez reduce el estímulo de las proteínas sensores celulares y por ende la respuesta antiviral. El poco o nulo efecto del tratamiento con PRA y M β CD sugiere que el bloqueo de la vía de síntesis de

colesterol es importante para el efecto observado en nuestros experimentos y que el tratamiento con un agente secuestrador de colesterol puede ser contrarrestado por la célula al aumentar tanto la producción como el transporte del colesterol al interior. Un estudio más detallado es necesario para dilucidar el mecanismo preciso en esta regulación.

CONCLUSIONES

1. Las diferentes propiedades antivirales de cinco estatinas fueron probadas y se logró, mediante tres aproximaciones diferentes de inhibición de colesterol (farmacológica, genética y química), evaluar diferentes aspectos de la modulación de la replicación del DENV 2 mediante el bloqueo de la vía del colesterol. Se pudo demostrar en este trabajo, que los niveles de colesterol intracelular celular parecen no participar directamente en los procesos que tienen lugar en etapas tempranas del ciclo viral (entrada y fusión) del DENV 2 y que resultados contrarios en otros trabajos podrían bien estar siendo dados por un efecto virucidal del compuesto utilizado.
2. De igual manera, se observó un aumento en los niveles de colesterol intracelular en todas las condiciones experimentales evaluadas, demostrando la capacidad del virus de inducir la producción de esta molécula para su beneficio. El aumento en los niveles de colesterol, pudiera bien estar dado por un aumento en el transporte del mismo o por un efecto directo en la producción *de novo* de colesterol. De cualquier manera, nuestros resultados comprueban que el DENV2 posee la capacidad de modificar vías metabólicas celulares para su beneficio y eventual aumento en la replicación viral.
3. La comparación de resultados de inhibición de la replicación viral con la reducción en los niveles de colesterol debido al tratamiento con estatinas y con ARNi-HMGCR, sugiere que el bloqueo de la vía de síntesis de colesterol no es suficiente por sí solo para explicar el efecto antiviral de estos compuestos y que otros mecanismos metabólicos podrían estar involucrados, ya sea de manera directa o indirectamente.
4. Un mecanismo alternativo de inhibición evaluado fue la modificación en la expresión de genes involucrados en la respuesta antiviral celular. Al medir los niveles de expresión de

genes de respuesta antiviral en nuestros experimentos se hace evidente que la infección por DENV 2 activa la respuesta antiviral en células Huh-7 al verse aumentada la expresión de genes en las vías principales de defensa celular, respuesta pro inflamatoria y de activación de interferón.

5. El tratamiento con inhibidores de la vía de síntesis de colesterol en células infectadas y más aún en células no infectadas, parece reducir en cierto grado, el estado inflamatorio de estas células oncogénicas y este fenómeno podría bien estar involucrado con la reducción del título viral al permitir el establecimiento de un estado homeostático saludable el cual pueda hacer frente a las infecciones de manera eficiente.
6. No está aún claro si la atenuación de la expresión de genes de respuesta antiviral mediada por LOV y ARNi-HMGCR está dada por la reducción en los niveles de DENV 2 como resultado de la reducción de colesterol; por un efecto anti-estrés celular que alivie en cierto grado el estado pro inflamatorio celular o mediante otro mecanismo desconocido. Sin embargo en nuestros ensayos confirmamos que esta atenuación de genes pro inflamatorios y de defensa celular es simultánea a la reducción en los niveles de DENV lo cual sugiere una relación entre ambos fenómenos. Ensayos más detallados son necesarios para dilucidar el papel desempeñado por cada uno de los componentes de la triada DENV, metabolismo de colesterol y respuesta antiviral celular.

Bibliografía

- [1] U. Desselberg, «Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases,» *Journal of Infectology*, vol. 40, pp. 3-15, 1999.
- [2] H. L. Ploegh , «Viral Strategies for Immune Evasion,» *Science*, vol. 280, pp. 248-253, 1998.
- [3] D. J. Gubler, «Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever,» *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 480-496, 1998.
- [4] C. P. Simmons, S. B. Halstead, A. Rothman, E. Harris, G. Screaton, R. Rico-Hesse, D. Vaughn, E. Holmes y M. Guzman, «Understanding pathogenesis, immune response and viral factors,» *Report on Dengue*, pp. 1-9, 2006.
- [5] «WHO infectiuos disease report,» 1998. [En línea]. Available: <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/graph1.html>. [Último acceso: 10 October 2011].
- [6] «The World Health Report- Changing History,» World Health Organization, 2004.
- [7] G. Mesa Ridel, I. Rodriguez Luis y J. Teja, «Las enfermedades emergentes y reemergenets; un problema de salud en las americas,» *Revista Panamericana de Salud Publica*, 2004.
- [8] M. G. Guzman, S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D. J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martinez, M. B. Nathan, J. L. Pelegirino, C. Simmons, S. Yoksan y R. W. Peeling, «Dengue: A continuing global threat,» vol. 8, nº 12, 2002.
- [9] M. Badii y J. Landeros, «Bionomía y epidemiología del dengue,» *International Journal of Good Conscience*, vol. 2, nº 2, pp. 286-297, 2007.
- [10] D. S. Shepard, L. Coudeville, A. Halasa Yara, B. Zambrano y G. H. Dayan, «Economic Impact of Dengue Illness in the Amaericas,» *American Jornal of Tropical Disease and Hygene*, vol. 84, nº 2, pp. 200 - 2007, 2011.
- [11] G.-S. Debarati y B. Shimmer, «Emerging Themes in Epidemiology,» *Department of Public Health and Epidemiology Université catholique de Louvain* , vol. 2, nº 1, pp. 1742-62, 2005.
- [12] Programa de Acción Específico 2007-2012, Mexico, D.F.: Secretaría de Salud de Mexico 2008, 2008.
- [13] F. Diaz, W. Black, A. J. Farfan, M. Loroño-Pino, K. Olson y B. Beaty, «Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective,» *Archives of Medical Research*, vol. 37, nº 6, pp. 760-773, 2006.

- [14] I. Torres-Galicia, D. Cortés-Poza y I. Becker, «Dengue en México: análisis de dos décadas,» *Gaceta Médica de México*, vol. 150, pp. 122-7, 2014.
- [15] S. Bhatt y S. E. Hay, «The global distribution and burden of Dengue,» *Nature*, vol. 504, n° 496, 2013.
- [16] E. A. Undurraga, M. Betancourt-Cravioto, J. Ramos-Castaneda, R. Martinez-Vega, J. Mendez-Galvan, D. J. Gubler, M. G. Guzman, S. Halstead, P. kuri-Morales, R. Tapia-Conyer y D. S. Shephard, «Economic and Disease Burden of Dengue in Mexico,» *Plos Neglected Tropical Diseases*, pp. 0-26, 2015.
- [17] H. Gomez Dantes, J. A. Farfan-Ale y E. Sarti, «Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2010 - 2011): A systematic Literature Search and Analysis,» *Plos Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, n° 11, 2014.
- [18] D. J. Gubler, P. Reiter, K. L. Ebi, W. Yap, R. Nasci y J. A. Patz, «Climate Variability and Change in Unites States: Potential Impacts on Vector- and Rodent-Borne Disease,» *Enviromental Health Perspectives*, 2001.
- [19] E. A. Henchal y J. R. Putnak, «The Dengue viruses,» vol. 3, n° 4, pp. 376-396, 1990.
- [20] M. L. Velandia y J. E. Castellanos, «Dengue virus: structure and viral cycle,» *Infectio*, vol. 15, n° 1, pp. 33 - 43, 2011.
- [21] E. G. Acosta, V. Castilla y E. B. Damonte, «Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells,» *Cellular Microbiology*, vol. 11, n° 10, pp. 1533 - 1549, 2009.
- [22] B. Lindenbach y C. Rice, «Flaviviridae: The viruses and their Replication,» de *Fields of Virology*, Philadelphia, PA, Lippincott-Williams & Wilkins, 2001, pp. 991 - 1041.
- [23] T. P. Monath, B. Fields, D. Knipa, R. Chanock y J. Malnick, «Flaviviruses,» *Virology*, pp. 955 - 1004, 1985.
- [24] T. Uribarren Berrueta, «DENGUE, FIEBRE CHIKUNGUNYA Y OTROS ARBOVIRUS,» Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Sep 2015. [En línea]. Available: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>. [Último acceso: 12 Sep 2015].
- [25] C. C. Jansen y N. W. Beebe, «The Dengue Vector Aedes Aegypti: what comes next?,» *Microbes and Infection*, vol. 12, pp. 272-279, 2010.
- [26] «World Health Report,» World Health Organization, 2007.
- [27] F. Vera-Polania, Y. Perilla-Gonzalez, D. Martinez-Pulgarin, J. Baquero-Rodriguez, M. Munoz-Urbano, M. Lagos-Gallego, G. Lagos-Grisales, S. Villegas y A. Rodriguez-

- Morales, «Bibliometric assessment of the Latin-American contributions in dengue,» *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, vol. 9, nº 3, pp. 195-201, 2014.
- [28] S. B. Halstead, S. Udomsakdi, P. Simasthien, P. Singharaj, P. Sukhavachana y A. Nisalak, «Observations related to Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic fever,» vol. 42, nº 5, pp. 261-275, 1970.
- [29] R. V. Gibbons, S. Kalanarooj, R. G. Jarman, A. Nisalak, D. W. Vaughn, T. P. Endy, M. P. J. Mammen y A. Srikiatkachorn, «Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences,» *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, nº 5, pp. 910-913, 2007.
- [30] R. S. Lanciotti, C. H. Calisher, D. J. Gubler, G.-j. Chang y A. V. Vorndam, «Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 30, nº 3, pp. 545-551, 1992.
- [31] R. W. Peeling, H. Artsob, J. L. Pelegrino, P. Buchy y S. Yoksan, «Evaluation of diagnostic Tests: Dengue,» *Nature*, pp. s30-s38, 2010.
- [32] S. Alcon, A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel y M. Flamand, «Enzyme-linked immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infection,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, nº 2, pp. 376-381, 2002.
- [33] J. Deen, L. Lum, E. Martinez y L. Huat Tan, «Dengue Guidance for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control,» World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2009.
- [34] S. Hadinegoro, J. Arredondo-García, M. Capeding, C. Deseda y M. Saville, «Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease,» *The New England Journal of Medicine*, 2015.
- [35] J. Peña y E. Harris, «Early Dengue Virus Protein Synthesis Induces Extensive Rearrangement of the Endoplasmic Reticulum Independent of the UPR and SREBP-2 Pathway,» *Plos One*, vol. 7, nº 6, 2012.
- [36] R. Perera, C. Riley, G. Isacc, A. S. Hopf-Jannash y R. Kuhn, «Dengue Virus Infection Perturb Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells,» *Plos Pathogens*, vol. 8, nº 3, 2012.
- [37] F. Carvalho, F. Carneiro, E. C. Martins, I. Assuncao-Miranda, A. Faustino, R. Pererira y N. C. Santos, «Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets(LD) is Potassium Ion Dependent and is Mediated by LD surface proteins,» *Journal of Virology*, vol. 86, nº 4, pp. 2096-2108, 2012.

- [38] N. Chazal y D. Gerlier , «Virus entry, assembly, Budding and Membrane Rafts,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, n° 2, pp. 226 - 237, 2003.
- [39] C.-J. Lee, H.-R. Lin, C.-L. Liao y Y.-L. Lin, «Cholesterol Effectively Blocks Entry of Flavivirus,» *Journal of Virology*, vol. 82, n° 13, pp. 6470 - 6480, 2008.
- [40] E. C. Vangorp, C. Suharti, A. T. Mairuhu, W. M. Dolmans, J. Van der Ven, P. R. Demacker y J. W. Van der Meer, «Changes in the Plasma Lipid Profile as a Potential Predictor of Clinical Outcome in Dengue Hemorrhagic Fever,» *Clinical Infectious Disease*, vol. 34, n° 8, pp. 1150 - 1153, 2002.
- [41] J. C. Suvarna y P. P. Rane, «Serum Lipid Profile: as a predictor of clinical outcome in dengue infection,» *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14, n° 5, pp. 576 - 585, 2009.
- [42] N. Gudleski-O'Regan, T. M. Greco, I. M. Cristea y T. Shenk, «Increased Expression of LDL Receptor-Related Protein 1 During Human Cytomegalovirus Infection Reduces Virion Cholesterol and Infectivity,» *Cell Host & Microbe*, vol. 12, pp. 86 - 96, 2012.
- [43] N. Ali, H. Allam, T. Bader, R. May, K. M. Basalingappa, W. L. Berry, P. Chandrakesan, D. F. Qu, N. Weygant, M. S. Bronze, S. Umar, R. Janknecht, S. Sureban, M. Huyke y C. W. Houchen, «Fluvastatin Interferes with Hepatitis C virus Replication Via Microtubule Bundling and a Doublecortin- like Kinase-Mediated Mechanism,» *Plos One*, vol. 8, n° 11, 2013.
- [44] R. Soto-Acosta, C. Mosso, M. Cervantes-Salazar, H. Puerta-Guardo, F. Medina, L. Favari, J. E. Ludert y R. M. Del Angel, «The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity,» *Virology*, vol. 442, pp. 132 - 147, 2013.
- [45] C. Rothwell , A. LeBreton, C. N. Young, J. Y. Lim, W. Liu, S. Vasudevan, M. Labow, F. Gu y A. L. Gaither, «Cholesterol Biosynthesis modulation regulates Dengue viral replication,» *Virology*, vol. 389, pp. 8 - 19, 2009.
- [46] A. C. Carro y E. B. Damonte, «Requirement of cholesterol in the viral Envelope for Dengue virus infection,» *Virus Research*, vol. 174, pp. 78-87, 2013.
- [47] M. Umashankar, C. Sanchez-San Martin, M. Liao, B. Reilly, A. Guo, G. Taylor y M. Kielian, «Differential Cholesterol Binding by Class II Fusion Proteins Determines Membrane Fusion Properties,» *Journal of Virology*, vol. 82, n° 18, pp. 9245 - 9253, 2008.
- [48] D. J. Maron, S. Fazio y L. F. MacRae, «Current Perspectives on Statins,» *Circulation*, 2000.

- [49] L. M. Cardoso Pavan, D. Rêgo Fortunato, S. Taveira Elias, G. Del Luca Canto y E. N. Silva Guerra, «In vitro Anti tumor effect of Statins on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review,» *Plos One*, vol. 10, nº 6, 2015.
- [50] D. Sviridov y M. Bukrinsky, «Interaction of pathogens with host cholesterol metabolism,» *Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins*, vol. 25, nº 5, pp. 333-8, 2014.
- [51] R. Guabiraba, R. E. Marquez, . A.-G. Besnard, C. T. Fagundes, D. G. Souza, B. Ryffel y M. M. Teixeira, «Role of the Chemokine Receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the Pathogenesis of Experimental Dengue Infection in Mice,» *Plos One*, vol. 5, nº 12, 2010.
- [52] J. Dai, W. Pan y P. Wang, «ISG15 facilitates cellular antiviral response to dengue and west nile virus infection in vitro,» *Virology Journal*, vol. 8, nº 468, 2011.
- [53] D. M. Carvalho, F. Goncalves Garcia, A. P. Sarreta Terra, A. C. Lopes Tosta, L. De Almeida Silva, L. R. Castellano y D. N. Silva Texeira, «Elevated Dengue virus Non-structural Protein 1 Serum Levels and Altered Toll-Like Receptor 4 Expression, Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Dengue Hemorrhagic Fever Patients,» *Journal of Tropical Medicine*, 2014.
- [54] M. Martinez-Gutierrez, J. Castellanos y J. Gallego-Gomez, «Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly,» *Intervirology*, vol. 54, nº 4, pp. 202-216, 2011.
- [55] M. Martinez-Gutierrez, L. A. Correa-Lonono, J. E. Castellanos y J. C. Gallego-Gomez, «Lovastatin Delays Infection and Increases Survival Rates in AG129 Mice Infected with Dengue Virus Serotype 2,» *Plos One*, vol. 9, nº 2, 2014.
- [56] J. Reyes-Del Valle, S. Chavez-Salinas, F. Medina y R. M. Del Angel, «Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells,» *Journal of Virology*, vol. 79, nº 8, pp. 4557-4567, 2005.
- [57] W. Jhonson, M. Phillips y G. Rothblat, «Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis,» *Sub-Cellular Biochemistry*, vol. 28, pp. 235 - 276, 1997.
- [58] K. M. Poh, S. Guangho, X. Xie, P.-Y. Shi, M. R. Wenk y F. Gu, «U18666A an Intracellular cholesterol transport inhibitor, inhibits Dengue virus entry and replication,» *Antiviral Research*, vol. 93, pp. 191-198, 2011.
- [59] S. R. Nogueira Ignácio Reis, A. L. Franco Sampaio, M. d. G. Muller Henriques, M. Gandini, E. Leal Azeredo y C. Fernandes Kubelka, «An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation,» *MEM INST OSWALDO CRUZ*, vol. 102, nº 8, pp. 983-990, 2007.

- [60] T. P. Endy, S. C. Weaver y K. A. Hanley, «Dengue Virus: Past, Present and Future,» pp. 1-8, 2010.
- [61] E. J. Arts y D. J. Hazuda, «HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy,» *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, pp. 1-23, 2012.
- [62] A. B. Jesudian, M. Gambarin-Gelwan y I. M. Jacobson, «Advances in the treatment of Hepatitis C Virus Infection,» *Gastroenterology & Hepatology*, pp. 91-101, 2012.
- [63] M. Kurokawa, T. Shimizu, W. Watanabe y K. Shiraki, «Development of New Antiviral Agents from Natural Products,» *The Open Antimicrobial Agents Journal*, vol. 2, pp. 49-57, 2010.
- [64] L. Milazzo, I. Caramma, M. Cesari, M. Olivetti, M. Galli y S. Antinori, «Fluvastatin as an adjuvant to pegylated interferon and ribavirin in HIV/hepatitis C virus genotype 1 co-infected patients: an open-label randomized controlled study,» *J Antimicrob Chemother*, vol. 65, pp. 735 - 740, 2010.
- [65] P. Clark, A. Thompson, M. Zhu, D. Vock, Q. Zhu, D. Ge, K. Patel, S. Harrison, T. Urban, S. Naggie y A. Muir, «Interleukin 28B polymorphisms are the only common genetic variants associated with low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in genotype-1 chronic hepatitis C and determine the association between LDL-C and treatment response,» *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 19, pp. 332 - 340, 2012.
- [66] M. A. Martín-Acebes, A.-B. Blazquez, N. Jimenez de Olla, E. Escribano-Romero y J. C. Saiz, «West Nile Virus Replication Requires Fatty Acid Synthesis but Is Independent on Phosphatidylinositol-4-Phosphate Lipids,» *Plos One*, vol. 6, nº 9, 2011.
- [67] L. Silva Da Cista, A. P. Pereira Da Silva, A. T. Da Poian y T. El-Bacha, «Mitochondrial Bioenergetic Alterations in Mouse Neuroblastoma Cells Infected with Sindbis Virus: Implications to Viral Replication and Neuronal Death,» *Plos One*, vol. 7, nº 4, 2012.

Anexo 1

Protocolo de cultivo de células C6/36 HT

Las células de mosquito se cultivan tradicionalmente a 28 °C, sin embargo Zhu y cols. demostraron que la clona C6/36 podía adaptarse a crecer a 36 °C pero bajo esas condiciones las células dejan de multiplicarse cuando la temperatura sobrepasa los 35 °C. Así, Kuno y Oliver (1989) enuncian que las líneas de células de insectos, altamente sensibles y acostumbrada a crecer a 28 °C al adaptarse a temperaturas más elevadas mejoran su capacidad para la replicación viral (siempre que la temperatura no exceda los 35 °C). Esta sublínea C6/36 HT está adaptada a crecer a 34 °C por Kuno y cols. Exhiben el mismo ECP que las C6/36 originales aunque éste se manifiesta más rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28 °C.

Materiales:

3. Medio de crecimiento: Eagle MEM + 1% aminoácidos no esenciales 100X + 2% solución glutamina 200mM + 1% vitaminas BME + 7% suero fetal bovino (SFB) (pH 6.8).
4. * Medio de inoculación o de mantenimiento: el mismo medio pero suplementado sólo con 2% de SFB.

Propagación de las células

- Elimine el medio de crecimiento de las células del frasco de 25cm².
- Añada 1ml de medio fresco y desprenda las células golpeando vigorosamente el frasco o bien realizando un raspado suave con “scraper” *No utilizar tripsina.
- Homogenice con pipeta.
- Resuspenda en medio de crecimiento de acuerdo al fin de las células en cultivo:

a) Si es para el pase de la línea realizar una separación de 1:8 ó ajustando la concentración a 1×10^4 cel\ml.

b) Si se prepara para aislamiento, aplique una división de células de 1:3 o 1:4 ó ajustando la concentración 1×10^5 cel\mL. Podrá utilizarse en 48h.

- Incubar a 340C.

Congelación

5. Añadir 4 mL de medio de crecimiento y 1 mL de SFB en un frasco de 10 mL rotulado como #1. Colóquelo en un baño de hielo.
6. Añadir 4 ml de medio y 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMS) en otro frasco de 10 mL rotulado como # 2. Colóquelo en un baño de hielo.
7. Decantar el medio de una placa en monocapa (monocapa confluyente de tres a cinco días de sembrada).
8. Con la pipeta de 5mL de punta curva, extraiga los 5 mL de la placa y desprenda las células como ya fue descrito.
9. Agregar la suspensión celular en el frasco #1.
10. Añadir con una pipeta de 5 mL el medio del frasco # 2 al frasco # 1, gota a gota y agitando (siempre en baño de hielo).
11. Colocar 1 mL de la suspensión celular ($1-2 \times 10^6$ células/mL) en cada vial de congelación y manténgalas en el baño de hielo.
12. Deje 0.1 mL para la prueba de esterilidad.
13. Guardar los viales a -20°C durante 1 hora

14. Pase los viales a una caja de poliespuma y guárdelas a -70 °C por toda la noche. (Viabiles de 6 meses a 1 año)

15. Coloque los viales en termo de nitrógeno líquido (-196). (Viabiles por 5 años)

Descongelación

16. Saque el vial del nitrógeno y échelo directamente en agua a 37 °C hasta que se descongele su contenido.

17. Desinfecte el vial (exterior) con alcohol al 70%

18. Con una pipeta de 1 mL extraiga el contenido del ampula y échelo en un frasco de 25 cm² que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Guarde a 28 °C.

19. Cambie el medio a las 24 horas, por medio fresco de crecimiento.

20. Cuando la monocapa esté completa pase las células dividiendo 1:5 inicialmente.

Protocolo de propagación de células BHK-21

Materiales

21. Cajas Petri de vidrio (10 cm)

22. Pipetas serológicas

1. Preparación del medio:

- a. Medio MEM base 9.7g
 - b. NaHCO_3 para cultivo celular 2.2 g
 - c. Se adiciona agua Mili Q a la mezcla hasta completar 1 L.
 - d. Se filtra la solución con membrana de $0.22\ \mu$
 - e. El medio MEM de crecimiento se suplementa con 7% SFB; 1X de aminoácidos esenciales; 1X de antibiótico-Antimicótico; 1X de L-Glutamina
 - f. Ajustar el pH a 8.0 con solución de NaHCO_3 al 7.5% esteril.
2. Se descongela un vial de células BHK-21 a $37\ ^\circ\text{C}$ y se añaden las células a una caja Petri adicionada con 10 mL de medio de crecimiento.
3. Las células de incuban a $37\ ^\circ\text{C}$ en atmosfera de CO_2 al 5%.

Congelación

1. A una caja confluyente se le retira el medio completamente y se agregan 3 mL de tripsina por 60 segundos.
2. Se aspira la tripsina completamente y se incuban las células a $37\ ^\circ\text{C}$ por 2 minutos.
3. Se despegan las células con chorros de medio de cultivo (5 mL) y se depositan en un tubo falcon de 15 ml.

4. Se centrifugan la suspensión celular a 200 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
5. Se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en 4 mL de medio de cultivo al 5% en DMSO esteril.
6. Se reparte el volumen de solución en viales de congelación y se almacenan a -70 °C en un recipiente Mr. Frosty (En baño de isopropanol) hasta su uso.

Descongelación

1. Se descongelan las células en baño maría a 37 °C por 1 min.
2. Se adicionan a una caja Petri con medio de cultivo y se incuba a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5% por 24h.
3. Cumplido el tiempo se cambia el medio por medio fresco.

Protocolo de Propagación de células Huh-7

Descongelación

Materiales

- Crioviales con células
- Medio de cultivo ADMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomicina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- Aminoácidos no esenciales (células Huh7 replicón) solución 10Mm (100X) marca GIBCO #11140-050, 100ml
- Hielera

Equipo

- Incubadora de CO₂
- Centrífuga
- Botellas para cultivo celular

Procedimiento

1. Descongelar inmediatamente un vial congelado de células Huh-7 parentales por inmersión en baño de agua a 37°C.
2. Colocar el contenido del vial en un tubo falcon de 15 ml, el cual debe contener 5 ml de mediocompleto (SBF + Antibiótico).

3. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 1 ml de medio completo.
5. Sembrar en una botella de 75 cm² en la que previamente se ha adicionado 9 ml de medio de cultivo completo.
6. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂.
7. Observar al siguiente día y si las células se encuentran adheridas, cambiar por medio fresco.

Congelación de células

Materiales

- Crioviales marca Corning #430659, 2ml
- Medio de cultivo ADMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Tripsina 1X marca GIBCO #15050-057, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomicina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- DMSO marca SIGMA #D2650, 100ml
- Hielera

Equipo

- Incubadora de CO₂
- Centrífuga

Procedimiento

1. Seguir el mismo protocolo de mantenimiento de líneas celulares hasta la tripsinización.
2. Colectar las células en un tubo falcón de 15 ml y centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
3. Retirar la tripsina y resuspender suavemente el botón de células con 925µL SBF (92.5%). Cada criovial debe contener 7.5% o 7.5mL de DMSO. De tal manera que en cada criovial queda una alícuota de 1mL.
4. Almacenar las células a -70°C por dos a tres horas, previo al almacenamiento definitivo en nitrógeno (fase de vapor).

Anexo 2

Protocolo de producción de Dengue virus

El protocolo descrito a continuación ha probado ser eficiente para la obtención de stocks virales con títulos altos desde 10^6 a 10^9 .

Materiales

1. Homogenizador Dounce (50 mL)
 2. Pipetas serológicas de 5 y 10 mL
 3. Placas de cultivo T-75
 4. Scrappers
 5. Centrifuga refrigerada
 6. Tubos falcon de 15 y 50 mL
 7. Solución de polietilen glicol al 40% (ver preparación de soluciones al final de este protocolo)
 8. Solución de buffer GNTE (ver preparación de soluciones al final de este protocolo)
 9. Tubos eppendorf de 200 uL.
-
- 23.** Se requieren cultivos de células C6/36 HT crecidas aproximadamente a una confluencia del 90 a 100%. (Botellas T-75)
 - 24.** Una semana antes de llevar a cabo el protocolo de propagación, deben sembrarse 2 cajas T-75 con células C6/36 HT en una cantidad tal que alcancen de 90 a 100% de confluencia en 7 días

(producción semilla). A la par se siembran 10 cajas T-75 con células C6/36 HT en una cantidad tal que alcancen de 90 a 100% de confluencia entre 9 y 10 días (producción a gran escala). (Puede variarse la cantidad de cajas manteniendo la proporción aquí mencionada)

1. Se retira el medio de las 2 cajas sembradas a alta confluencia.
2. Se infectan las células adicionando sobre la monocapa, virus aislados de una producción previa. (1 tubo de 200 uL por caja).
3. Se adicionan a la caja 4 mL de medio de inoculación y se incuban a 34 °C por dos horas agitando las células cada 20 min.
4. Se adicionan 6 mL de medio de inoculación y se incuban las células entre 48 y 72 h hasta observar ECP.
5. Una vez observado ECP a lo largo de la monocapa, se raspan las células con scrapper y se pasan a un tubo falcón de 50 mL en hielo.
6. Se lisan mecánicamente las células con 20 golpes en el homogenizador Dounce (en frío).
7. Se centrifuga el extracto celular en centrifuga refrigerada a 1500 rpm, a 4 °C por 5 min.
8. El sobrenadante se divide equitativamente entre las cajas sembradas a confluencia media que para ese momento deben haber alcanzado la confluencia deseada.
9. Se repite el proceso de infección (paso 2 al 7) con la diferencia de que solo se completa el volumen de las cajas con 2 mL más después de infectar para la incubación de 2 h.
10. Después del centrifugado del extracto celular de la producción a gran escala, el sobrenadante se mezcla con ¼ de solución PEG 40% previamente preparada y fría. A la mezcla se le dan 10 golpes en el homogenizador Dounce y posteriormente se divide en 4 tubos falcon de 50 mL. (Todo en frío)

11. Se incuban los tubos en refrigeración entre 2 y 8 °C toda la noche.
12. Al día siguiente a la mezcla se le dan otros 10 golpes con el homogenizador y se centrifuga en frío a 6,000 rpm por 90 minutos (de manera alternativa pueden ser 3 h a 4000 rpm) a 4 °C.
13. Se desecha el sobrenadante y al precipitado se le resuspende con 2 mL de buffer GNTTE en frío. (2 mL a cada tubo)
14. Se mezcla el contenido de los tubos y se reparte en tubos eppendorf de 200 uL para su posterior almacenamiento a -70 °C (Separar un tubo para titulación). A esta temperatura los stocks se mantienen por 6 meses a partir de los cuales empieza a decaer el título viral.

Preparacion de soluciones

PEG al 40%:

1. 40g de PEG 8000 en polvo se aforan a 100 mL con una solución de NaCl 2M.
2. Esterilizar y seguidamente mantener en frío (2 – 8 °C) hasta su uso.

Buffer GNTTE:

25. Glicina 200 mM

26. NaCl 100 mM

27. EDTA 1 mM

28. Tris-base 50 mM

Ajustar el pH a 7.5 y esterilizar. Mantener en frío (2 – 8 °C) hasta su uso.

PROTOCOLO DE TITULACION DEL VIRUS DEL DENGUE POR DILUCION LIMITANTE – MÉTODO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (UFPs)

Reactivos

- Carboximetilcelulosa (CMC) al 1%
 - A 50 mL de agua destilada se añaden 0.5g de CMC dejando que se disuelva a temperatura ambiente durante toda la noche. Después, esterilizar en autoclave. (Ajustar el pH a 8.0).

- Medio Overlay:

- | | |
|----------------------------|---------------|
| ○ SBF | 10 mL |
| ○ L-glutamina | 1 mL de 100X |
| ○ 2X MEM (MBA) sin R.Fenol | 100 mL |
| ○ CMC 1% esteril | 50 mL |
| ○ Antibióticos | 1 mL del 100X |

Ajustar el pH a 8.0 – 8.5 con solución de NaHCO₃ al 7.5% esteril.

- Colorante Naftol Blue Black:

- | | |
|-------------------------|--------|
| ○ Naftol Blue Black | 1 g |
| ○ Acetato de Sodio | 13.6 g |
| ○ Ácido acético glacial | 60 mL |

H₂O a completar 1000 mL

- Solución de azul tripano:
 - 0.4 g de azul tripano
 - PBS 1X hasta completar 100mL

- Se utilizan células BHK-21, desprender las células de acuerdo al protocolo ya establecido.
- Se realiza la cuenta viable con azul tripano.
- Se siembran 150,000 células en 0.5 ml de medio suplementado en cada pozo en placas de 24 pozos.
- Se incuban a 37°C por 24 hrs.
- Mientras tanto preparar un grupo de tubos marcados 10^{-1} a 10^{-8} , pipetear en condiciones de esterilidad con 180uL del diluyente (medio Hanks con 0.5% de SBF) en cada tubo. Mantenerlos en hielo.
- Descongelar rápidamente el virus a titular (4°C) y transferir 20 uL del virus al primer tubo con diluyente (10^{-1}).
- Mezclar vigorosamente con vortex.
- Transferir 20 uL de la dilución del virus 10^{-1} al siguiente tubo y así sucesivamente, cada vez con una puntilla nueva.
- Se añaden 50 uL de la dilución viral a cada pozo por duplicado. El último grupo de 2 pozos servirá como control negativo, solo adicionar diluyente Hanks.

- Las placas se incuban por 2 horas a 37°C en ambiente de CO₂ al 5%.
- Finalmente se añaden 0.5 mL de medio overlay a cada pozo en incubar a 37°C por 4-5 días (para serotipo 2).
- Al término de la incubación se decanta el contenido de los pozos en un recipiente con solución de cloro al 10%.
- Lavar la placa con agua corriente sumergiéndola suavemente.
- Cada pozo se tiñe con 0.5 mL de solución de NBB (Naftol Blue Black).
- Las placas se incuban por 30 min a Temp. Ambiente.
- Se lavan nuevamente con agua de la manera descrita anteriormente y se dejan secar al aire para finalmente contar las PFUs.

Para el Cálculo de las PFUs se utiliza la siguiente formula:

PFUs/mL: $(P) (20) (10^{-x})$, donde P es el promedio del número de placas líticas obtenido en el pozo correspondiente; 20 es el factor de corrección para expresar el título en PFUs/mL y 10^{-x} es el factor de la dilución empleada en el pozo donde se contaron las placas.

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot* y *Rita Lang*.

Materiales

☐ Material vivo

- Líneas celulares tumorales
- Cultivos primarios de tejido sano.

☐ Extractos, sustancias ó moléculas a probar.

☐ Soluciones y reactivos.

- Medio de cultivo
- Tripsina EDTA
- Suero fetal bovino
- MTT
- Diluyente (HCL)

☐ Equipos.

- Cabina de flujo laminar
- Incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂
- Centrífuga
- Micropipetas
- Lector de Elisa
- Microscopio invertido

☐ **Otros**

- Cajas de cultivo de 96 pozos

Metodología.

1. Sembrar las células en placas de 96 pozos y dejar estabilizar por 24 h. Para nuestro ensayo se sembraron 25,000 células por pozo.
2. Se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.
3. Se prepara el extracto, fracción o sustancia en DMSO (0.2 %, concentración no tóxica). De tal manera que al añadir 20 µL al pozo tenga la concentración deseada.
4. Se añaden 20 µL de la sustancia problema por pozo.
5. Se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas o durante el tiempo determinado de acuerdo a los tiempos a probar en los ensayos experimentales para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo.
6. Se descarta el medio.
7. Se coloca 100 µL de medio sin suero por pozo.
8. Se añade 20 µL de MTT a cada pozo.

9. Se incuba por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán.
10. Se añade 100 µL de diluyente proveído en el kit.
11. Se dejan los cultivos en la incubadora hasta el día siguiente ya que los cristales de formazán estén disueltos.

La lectura de densidad óptica (DO) se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{DO células tratadas} / \text{DO células control} \times 100$$

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas las cuales deben dar una lectura de DO mayor ó igual a 1. Los valores de comparación se hacen sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC50) en las células tratadas con los agentes específicos.

Protocolo de Transfección siPort NeoFX

Materiales:

- Agente transfectante siPort NeoFX
 - Células adherentes en cantidad suficiente para las condiciones experimentales
 - Medio de cultivo con y sin suero
 - Tubos eppendorf de 1mL y placas de cultivo (6, 12 y/o 24 pozos)
 - Pipetas semiautomáticas de 10, 200 y 1000 μ L.
-
1. Se diluye en agente transfectante en medio de cultivo ADMEM sin SBF. (1.5 μ L de siPort NeoFX en 23.5 μ L de ADMEM sin SBF) por pozo en placas de 24 pozos. (para placas de diferente tamaño, ajustar la cantidad). Preparar suficiente tomando en cuenta la cantidad de cada ANRi.
 2. Se incuba 10 min a temperatura ambiente.
 3. A la par se diluye en ARNi a utilizar (ARNi-HMGCR; ARNi-GAPDH y ARNi-Control Negativo) en medio de cultivo sin SBF para obtener una conc. Final de 150nM en la transfección. (1.5 μ L de stock ARNi [50 μ M] en 500 μ L de medio). Preparar la cantidad deseada de cada ARNi por separado.
 4. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
 5. Cumplido el tiempo de incubación, mezclar la solución de siPort NeoFX con cada ARNi por separado.
 6. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.

7. Realizar la tripsinización y conteo de células para plaqueo. Ajustar el volumen de plaqueo a 450 μ L para cada pozo (50,000 células) en placas de 24 pozos. (si se usan placas de tamaño diferente, ajustar de acuerdo al tamaño).
8. Una vez listas las células, se plaquean en sus pozos correspondientes (450 μ L: 50,000 células por pozo).
9. Inmediatamente después de plaquear una caja, se agregan 50 μ L de cada ANRi en los pozos designados para cada condición. (Es importante que no pase mucho tiempo entre el plaqueo e las células y la adición del ARNi con el agente transfectante ya que la transfección es simultánea a la adherencia).

Protocolo de Extracción de ARN total

Nota: este protocolo de extracción se utiliza para la extracción de ARN total de células adherentes en placa.

1. Homogenización: Aspirar todo el medio de cultivo de la placa o pozo. Adicionar 200 μ L de reactivo Trizol a la botella o pozo (este volumen es para placas de 6 y 12 pozos, debe ajustarse en función del tamaño de pozo a extraer). Mezclar y pasar el contenido a un tubo eppendorf de 1.5 μ L.
2. Separación: incubar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disolución completa de proteínas.
3. Añadir 40 μ L de cloroformo por cada 200 μ L de trizol y mezclar por inversión durante 20 segundos.
4. Incubar el o los tubos en frío 3 min, y centrifugar a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C.
5. Precipitación: Después de la centrifugación, recuperar la fase acuosa, pasarla a un tubo nuevo y adicionar 100 μ L de isopropanol.
6. Incubar por 1 hora o toda la noche a -80 °C.
7. Una vez cumplido el tiempo, centrifugar a 13,000 rpm por 15 min. A 4°C.
8. Lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 200 μ L de etanol al 70% (Preparado con H₂O DEPC). Mezclar con vortex
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min a 4°C y retirar el etanol cuidadosamente con pipeta.
10. Resuspender la pastilla de ARN en 12 μ L de H₂O DEPC y almacenar a -80°C.

PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN (RT-PCR M-MLV)

1. Una vez obtenido el ARN total de una serie de experimentos, se procede a la retrotranscripción del mismo para la obtención de cDNA. Las muestras se descongelan en hielo.
2. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL mezclar los siguientes reactivos (1x):
3. Reactivos mezcla 1 para RT-PCR MMLV

Reactivos	Volumen
Random primer	1 μ L
ARN [x]	5 μ L
Agua DEPC	cbp 11.5 μ L
Vol. Final	11.5 μ L

4. Incubar 10 min a 72 °C en termociclador.
5. Pausar el termociclador, enfriar tubos a 4 °C en hielo 3 minutos (No exceder tiempo)
6. Agregar 8.5 μ L de la mezcla 2 (1X)
- 7.

TABLA 8
Reactivos mezcla 2 para RT-PCR MMLV

Reactivos	Volumen
Buffer 5x	4 µL
DTT	2 µL
RNase out	0.5 µL
DNTP's	1 µL
MMLV	1 µL
Volumen Final	8.5 µL

- 5 Programar termociclador con las siguientes condiciones:

TABLA 9
Condiciones de RT-PCR

	Tiempo	Temperatura
1	10 min	25 °C
2	1 hora	37 °C
3	5 min	94 °C
4	10 min	4 °C

8. Después de que se obtiene el cDNA llevar a cabo la cuantificación del mismo, así como diluciones de 25 ng/µL en agua DEPC y cuantificar dichas diluciones para comprobar su concentración.

PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL

- El ensayo de PCR en tiempo real se lleva a cabo en el equipo STEP ONE de Applied Biosystems 7500.
 - Especificaciones: Utilizar guantes sin talco, Usar km wipes y pipetas designadas solo para este ensayo; utilizar puntillas con filtro.
1. La reacción se lleva a cabo con el siguiente mix de reacción por tubo:
 - a. 10 μ L de mastermix
 - b. 8 μ L de H₂O DEPC
 - c. 1 μ L de sonda taqman (si es SYBR Green se agrega 1 μ L de cada primer y se resta 1 μ L de H₂O DEPC)
 - d. 1 μ L de cDNA de cada muestra
 2. Se lleva a cabo el programa estándar con 40 ciclos de amplificación.

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE COLESTEROL INTRACELULAR

Materiales

- Células en cultivo (en placas de 6 pozos plaquear 250,000 células)
- Scrappers
- Pipetas semi automáticas
- Buffer de lisis (1.5mMMgCl₂, Tris– HCl pH7.5 10mM, 10mM NaCl, 1% IGEPAL)
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Hielo

1. Se plaquean las células para las diferentes condiciones y se tratan de acuerdo al experimento.
2. Una vez cumplidos los tiempos experimentales se aspira y desecha el medio de cada pozo y se lavan las células. Se agregan 200 µL de buffer (1.5mMMgCl₂, Tris– HCl pH7.5 10mM, 10mM NaCl, 1% IGEPAL) frío.
3. Se utiliza un scraper para despegar algún remanente celular aun adherido a la placa y se colecta el contenido del pozo en un tubo eppendorf de 600 µL (el extracto celular debe mantenerse todo el tiempo en hielo).
4. Se centrifuga el extracto celular a 10,000 rpm a 4°C.
5. Se descarta el precipitado y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Se desempaca el contenido del kit y se descongela a temperatura ambiente.
7. Se preparan muestras estándar en tubos pre-designados de la A a la H. como se muestra en la figura:

Tube	200 μ M Cholesterol Standard (μ l)	Assay Buffer (μ l)	Final Concentration (μ M cholesterol)
A	0	1,000	0
B	10	990	2
C	20	980	4
D	30	970	6
E	40	960	8
F	60	940	12
G	80	920	16
H	100	900	20

8. Se prepara la placa de 96 pozos del kit designando dos pozos para cada muestra incluyendo las muestras estándar.
9. Se agregan 50 μ L de cada muestra y estándar a los pozos. (ver diagrama).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
B	B	B	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
C	C	C	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
D	D	D	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
E	E	E	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
F	F	F	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
G	G	G	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
H	H	H	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

10. Se cubre la placa con el cobertor provisto en el kit y se procede a preparar el cocktail de ensayo.
11. Para la preparación del cocktail: Se mezclan el buffer de ensayo (4.745 ml); Cholesterol detector (150 μ L); HRP (50 μ L); Cholesterol oxidase (50 μ L) y Cholesterol esterase (5 μ L).

Nota: Este volumen provee suficiente reactivo para la placa entera. Ajustar de acuerdo al número de pozos a utilizar.
12. Remover el cobertor y comenzar la reacción añadiendo 50 μ L de cocktail de reacción a cada pozo.
13. Cubrir la placa e incubar por 30 minutos a 37°C protegido de la luz.
14. Una vez cumplido el tiempo, remover la cubierta y leer la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 530 – 580 nm y una de emisión de 585 – 595 nm.
15. Los resultados se calculan en base a la curva estándar.

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PCR ARRAY

- Se muestra un esquema de los pasos a seguir:



1. Las muestras a analizar son lisadas con un buffer conteniendo el desnaturizante de alto grado isotiocianato de guanidina, el cual de manera inmediata inactiva las RNAsas presentes para asegurar el aislamiento efectivo del ARN.
2. El lisado es pasado por una columna gDNA eliminator column, la cual remueve de manera efectiva el ADN genómico.
3. La muestra es después pasada por una columna RNAeasy spin column la cual une al ARN de la muestra para su lavado.
4. Una vez lavado la muestra es eluida con H₂O DEPC (30 µL).

5. El siguiente paso consiste en la conversión de ARN a cDNA, mediante el kit RT2 First strand kit.
6. Una vez obtenido el cDNA Su calidad es evaluado utilizando el dispositivo experion para electroforesis capilar. Un RQI mayor a 8 es requerido para continuar con el ensayo de PCR array.
7. Seguidamente se prepara el ensayo de PCR array. Las placas de 96 pozos contienen primers liofilizados para cada gen a analizar.
8. Se utiliza una placa por muestra. Cada muestra se mezcla con el RT2 SYBR green Mastermix provisto en el kit y se depositan 20 μ L en cada pozo.
9. La placa se centrifuga y posteriormente se corre en el termociclador para tiempo real. Programa estándar 40 ciclos.